Zur Komplexität des Mureinhydrolasen-Systems in Escherichia coli

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG KECK
aus Stuttgart

1980

Zur Komplexität des Mureinhydrolasen-Systems in Escherichia coli

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG KECK
aus Stuttgart

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1980

Dekan: Prof. Dr. W. Seyffert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Gierer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

Helmut und Ursula Keck

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. U. Schwarz am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen durchgeführt. Für zahlreiche Anregungen und Diskussionen danke ich Herrn Dr. Uli Schwarz und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe.

Besonders danken möchte ich Angelika Funk für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Experimente, Dr. Ronald Verwer für die nette Zusammenarbeit, die Amsterdamer Pilsjes und die Einführung in die ostasiatische Lebensart, Dr. N. Nanninga und Dr. H. Frank für die Unterstützung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Herrn G. Berger danke ich für die gute Ausführung der Graphiken, Frau B. Springmann und Frau R. Grömke für die ausgezeichneten Abbildungen, Frau I. Baxivanelis für das sorgfältige Schreiben der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0058

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung

Seite

- Struktur und Funktion der Zellhülle gram-negativer Bakterien 1
- Struktur und Metabolismus des Mureins von Escherichia coli 2
- Mureinsynthetasen und Mureinhydrolasen 8
- Penicillin-Bindeproteine 10
- Abkürzungen 13

II Material und Methoden

- Bakterienstämme und Kulturbedingungen 14
  - Escherichia coli PA 3092 Dpm
  - Escherichia coli W 173-25/7
- Substrate 15
  - Unmarkierte Sacculi
  - ^{3}H-Dpm markierte Sacculi
  - Sacculi für Elektronenmikroskopie
  - Muropeptide
  - Mureinvorstufen
- Mureinhydrolasentests 17
  - Transglykosylase
  - DD-Endopeptidase
  - DD-Carboxypeptidase
  - LD-Carboxypeptidase
  - Amidase
- Trennung von Muropeptiden 20
  - Papierchromatographie
  - Dünnschichtchromatographie
  - Hochspannungs-Papierelektrophorese

- Quantitative Bestimmung der Diaminopimelinsäure 21
- Bestimmung der SDS-Konzentration 21
- Bestimmung der Proteinkonzentration 22
- Leitfähigkeitsmessung 22
- Messung der Radioaktivität 22
- Isoelektrische Fokussierung 23
- SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 23
- Radiomarkierung von Penicillin-Bindeproteinen 25
- Fluorographie 25
- Enzymatische Verdauung von Mureinsacculi für Elektronenmikroskopische Untersuchungen 26
- Kontrastierung und Elektronenmikroskopie 26
- Chemikalien 27

III Ergebnisse und Diskussion

Teil 1

Reinigung und Charakterisierung einer neuen Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase 28
- Zellaufschluß
- Chromatographie über CM- und DEAE-Sepharose 29
- Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose 29
- Isoelektrische Fokussierung 34
- Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung 36
- Hemmung der Endopeptidase durch ß-Lactam Antibiotika 36
- Hemmung der Endopeptidase durch DNS, Polynukleotide und Heparin 36
- pH-Optimum, Mg^{2+}- und Triton-Abhängigkeit der Endopeptidaseaktivität 40
- Bestimmung der Michaelis-Konstante 41
- Substrate 42
- Diskussion 43

Teil 2

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus 45

- Präparation der Sacculi 45
- Inkubation mit Endopeptidase 46
- Inkubation mit Transglykosylase oder Lysozym 47
- Diskussion 50

Teil 3

Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB und Identifizierung des Enzyms als Pencillin-Bindeprotein 4 53

- Zellaufschluß und Membranextraktion 54
- Chromatographie über CM-Sepharose 56
- Chromatographie über Hydroxylapatit 58
- Isoelektrische Fokussierung 60
- Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose 62
- Identifizierung der DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB als Penicillin-Bindeprotein 4 64
- Diskussion 66

Teil 4

Reinigung von Murein-Transglykosylasen aus Escherichia coli 68

- Zellaufschluß und Membranextraktion 68
- Chromatographie des Rohextraktes über CM-Sepharose 69
- Chromatographie über Hydroxylapatit 72
- Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose 72
- Affinitätschromatographie über Heparin-Sepharose 74
- Isoelektrische Fokussierung 77
- Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung 79

- Hemmung der Transglykosylse durch DNS, Polynukleotide und Heparin 81
- Diskussion 83

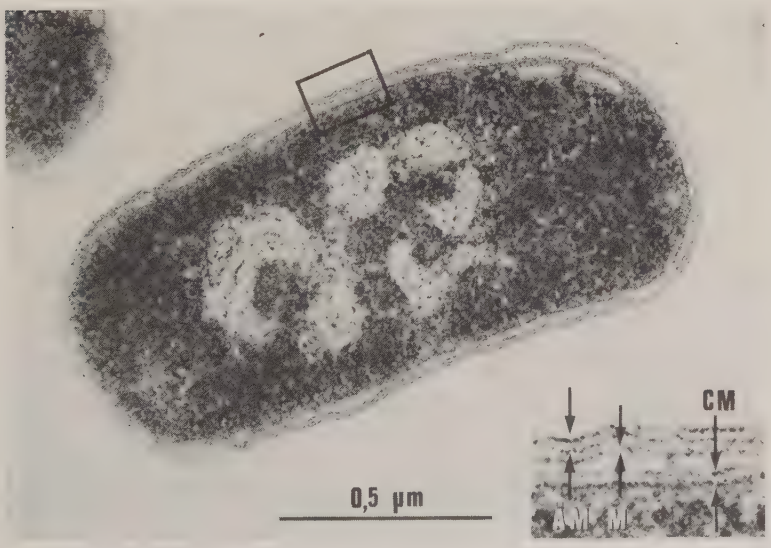
IV Zusammenfassung 89

V Literaturverzeichnis 91

I Einleitung

Struktur und Funktion der Zellhülle gram-negativer Bakterien. Die Zellhülle gram-negativer Bakterien ist aus der äußeren Membran, der Cytoplasmamembran und der zwischen diesen beiden Membranen im periplasmatischen Raum liegenden Mureinschicht aufgebaut (1). Diese drei Schichten bilden die Zellhülle, die für die Zelle eine Barriere zwischen dem Cytoplasma und der Umgebung darstellt (Abb. 1). Außerdem wird die Einhaltung der äußeren Form und die osmotische Stabilität des Bakteriums durch die Zellwand gewährleistet (2).

Abbildung 1: Aufbau der Zellhülle von Escherichia coli.



Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch Escherichia coli, kontrastiert mit Bleiacetat. ÄM = Äußere Membran; M = Murein; CM = Cytoplasmamembran. Endvergrößerung 80 000fach. Ausschnittvergrößerung 240 000-fach. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. H. Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, zur Verfügung gestellt.

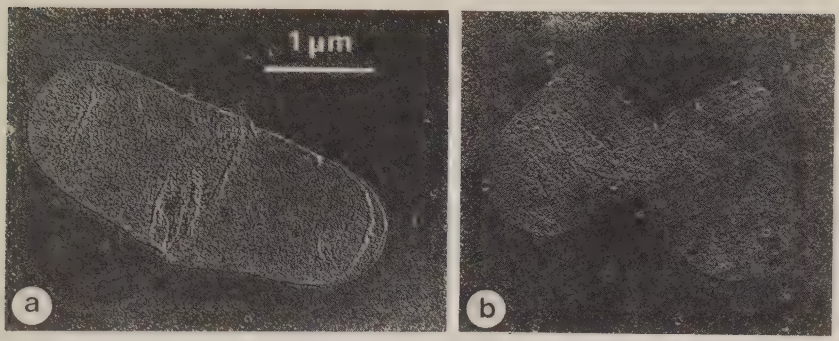
Die äußere Membran, die nur bei gram-negativen Bakterien gefunden wird, ist für die im Vergleich zu gram-positiven Bakterien geringe Permeabilität der Zellhülle für Antibiotika, Metabolite und andere Moleküle verantwortlich (3). Die äußere Membran ist eine heterogen aufgebaute Doppelmembran. Sie enthält neben Phospholipiden noch Lipopolysaccharide, Proteïne und Lipoprotein (4). Die Proteine der äußeren Membran haben außer einer rein strukturellen Funktion beim Aufbau der Membran auch eine Funktion als Rezeptoren für Phagen, Colicine und den Transport von Substanzen durch die äußere Membran (4). Eine Ausnahme unter den Hauptproteinen der äußeren Membran bildet das Lipoprotein in Escherichia coli. Es konnte bis jetzt kein Phage gefunden werden, der an dieses Protein bindet. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen das Lipoprotein konnte gezeigt werden, daß dieses Protein nur in Lipopolysaccharid-Mutanten von außen zugänglich wird (5). Ein Drittel der Lipoprotein-Moleküle sind kovalent an das darunterliegende Murein gebunden, die restlichen zwei Drittel liegen als freies Lipoprotein in der äußeren Membran vor (6, 7).

Das Murein ist ein die ganze Zelle umschließendes Makromolekül und kann durch schonende Präparation aus Bakterien als intakter Mureinsacculus isoliert werden (Abb. 2). Dieser Sacculus ist das die Form erhaltende und die Festigkeit bestimmende Element der Zellwand (8). Die Cytoplasmamembran stellt die eigentliche osmotische Barriere der Bakterienzelle dar. Sie enthält neben Phospholipiden Proteine und Enzyme, die an der oxidativen Phosphorylierung, am Transport von Substanzen und an der Synthese von Phospholipiden, Mureinbausteinen und Lipopolysacchariden beteiligt sind (9).

Struktur und Metabolismus des Mureins von Escherichia coli.

Alle Bakterien besitzen, von einigen Ausnahmen abgesehen, einen Mureinsacculus (10, 11, 12), der auch nach Isolierung noch die Zellgestalt wiederspiegelt (Abb. 2 und 12 a, b).

Abbildung 2: Aus Escherichia coli isolierte Mureinsacculi.



Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Mureinsacculi aus Escherichia coli nach Inkubation mit Penicillin. Die Sacculi weisen einen scharfen Schnitt als Ergebnis lokalisierter Hydrolasenaktivität auf, Endvergrößerung 18 000fach. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. H. Frank zur Verfügung gestellt (13).

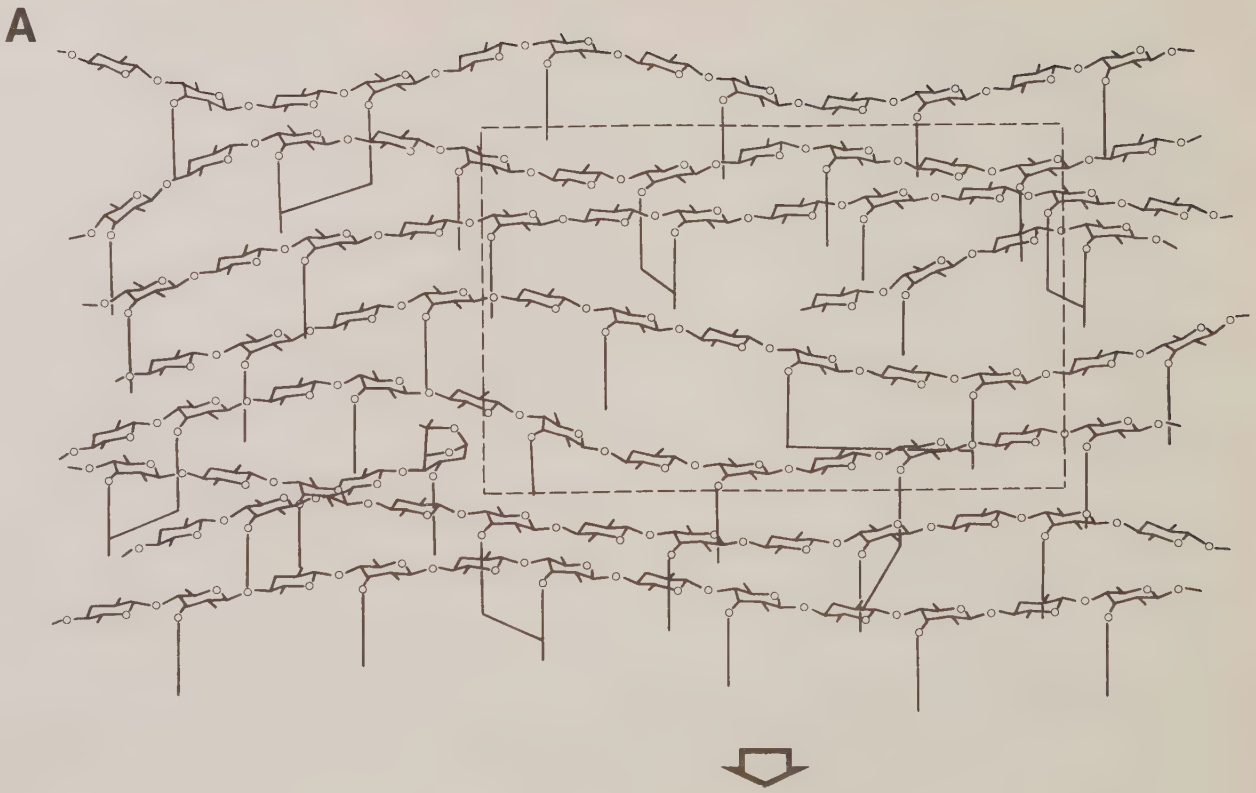
Bei Escherichia coli, wie auch bei den anderen gram-negativen Bakterien, besteht dieses Mureingerüst nur aus einem einschichtigen Netzwerk aus langen Zuckerketten, die über kurze Peptidbrücken miteinander verknüpft sind (14). Der molekulare Aufbau des Mureins ist durch chemische Analyse recht gut bekannt. Die Zuckerketten, in denen alternierend N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure ß 1-4 glykosidisch miteinander verknüpft sind, haben eine durchschnittliche Länge von 35 - 50 Disaccharid-Einheiten (15, 16). Die Peptidseitenketten sind über Peptidbindungen an die Lactylgruppe der N-Acetylmuraminsäure geknüpft. Durchschnittlich sind etwa 30 % der Peptidseitenketten untereinander quervernetzt (17). An die freie Carboxylgruppe der Diaminopimelinsäure etwa jeder 10. Peptidseitenkette ist ein Lipoproteinmolekül gebunden, das mit seinem lipophilen Ende in die äußere Membran ragt und so das Murein in der äußeren Membran verankert (6, 18).
Der Mureinsacculus wird von Lysozym in die in Abbildung 4 dargestellten Muropeptide C3/C4, C5/C6, und zu einem geringen Teil in X/X' gespalten (19).

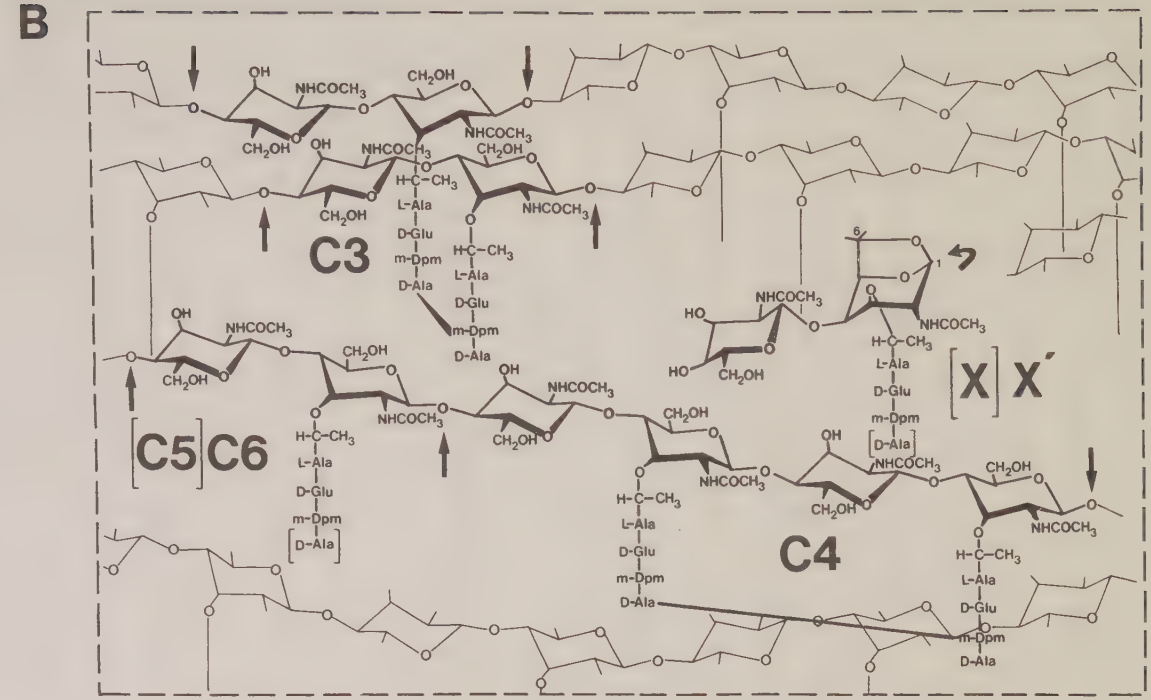
Diese Muropeptide stellen die Grundbausteine des Mureingerüsts dar. Das potentiell reduzierende Ende der N-Acetylmuraminsäure in den Muropeptiden X/X' ist durch eine intramolekulare 1,6-Anhydrobindung verschlossen (20, 21). Es wird vermutet, daß jeweils ein Muropeptid X oder X' das N-Acetylmuraminsäure-Ende der Zuckerketten bildet (20, 22).

Der recht stabile Mureinsacculus ist nun keineswegs ein starres Gebilde, er unterliegt notwendigerweise während des Zellzyklus ständigen Veränderungen. Da die Bakterienzelle von diesem Makromolekül völlig umschlossen ist, ergibt sich für die wachsende und sich teilende Zelle das Problem, daß auch der Sacculus wachsen muß und neue Polkappen ausgebildet werden müssen. Um das kovalent geschlossene Mureingerüst durch Einbau neuen Materials erweitern zu können, wird angenommen, daß kovalente Bindungen gezielt gespalten werden, ohne daß dies zur Lyse der Zelle führt (23). Mureinsynthetasen knüpfen dann an diesen Stellen Mureinvorstufen ein und schließen den Sacculus unter Einhaltung der für das Bakterium genetisch festgelegten Form wieder. Für ein normales Wachstum der Bakterien muß demnach ein ausbalanciertes Zusammenwirken der Mureinhydrolasen und -synthetasen gewährleistet sein (10). Beide Enzymsysteme müssen topologisch kontrolliert sein und sind daher für die Untersuchung morphologisch kontrollierter Vorgänge von Interesse (17). Die Notwendigkeit eines koordinierten Zusammenwirkens beider Systeme wird deutlich, wenn unter Penicillin-Einwirkung der Einbau neuen Materials gestört ist und das Mureingerüst durch die noch aktiven Hydrolasen aufgelockert wird bis die Zelle schließlich lysiert (13). Soweit untersucht, gibt es in der Verteilung der Mureinhydrolasen im zylindrischen Mittelteil der Zellen und den Polkappen keinen Unterschied (24). Zumindest einige Mureinhydrolasen und -synthetasen scheinen während eines bestimmten Stadiums der Zellteilung aktiviert zu werden (25, 26). Eine Autolyse der Bakterien durch unkontrollierte Aktivität der zelleigenen Hydrolasen muß in normal wachsenden Zellen durch eine strenge Regulation dieser Enzyme

verhindert werden (27). Sacculi, die aus in Gegenwart von Penicillin gezüchteten Zellen isoliert werden, zeigen einen scharfen Schnitt in der Teilungsebene, der auf topologisch kontrollierte Hydrolasenaktivität zurückzuführen ist (Abb. 2) (13). Verfolgt man den Einbau radioaktiv markierter Mureinvorstufen in den Sacculus mit Hilfe der Autoradiographie, so läßt sich neu eingebautes Material nur in einer recht scharfen Zone in der Mitte der Zellen nachweisen (28, 29). Dies bedeutet, daß auch die Mureinsynthetasen topologisch kontrolliert arbeiten. Das neu in die Wachstumszone des Sacculus eingebaute Material wird dann schnell über den ganzen Sacculus verteilt (28, 30). Auch für diese Umverteilung und Neuorganisation des Mureins müssen Mureinhydrolasen und -synthetasen in regulierter Weise zusammenarbeiten.

Abbildung 3: Molekularer Aufbau des Mureins.





A Schematische Übersicht eines Ausschnitts aus dem Mureingerüst. Die Peptidseitenketten sind vereinfacht durch gerade Linien dargestellt. **B** Vergrößerung des Ausschnitts aus Abb. A. Die Grundbausteine (Lysozymspaltprodukte C3/C4 und C5/C6) des Mureins und die Spaltprodukte (X/X') der Transglykosylase wurden hervorgehoben. ➞ Spaltstellen des Lysozyms. ↶ Spaltstelle der Transglykosylase.

Mureinsynthetasen und Mureinhydrolasen. Die Mureinbiosynthese ist ein sehr komplexer Vorgang, der bis heute noch nicht richtig verstanden wird (31). Der Syntheseweg der Mureinvorstufen wurde bis zur Bereitstellung der an ein Lipid-Trägermolekül gebundenen monomeren Untereinheit N-Acetylglucosamin-N-Acetylmuraminsäure-pentapeptid-C_{55}-isoprenoid genau untersucht (32). Die eigentliche Polymerisation der monomeren Mureinvorstufen oder der Einbau dieser Vorstufen in das bereits bestehende Murein ist noch nicht geklärt (33, 34, 35). Einem detaillierten Studium der membranabhängigen Prozesse bei der Mureinbiosynthese stehen bis jetzt Probleme beim Nachweis der Synthetaseaktivitäten in vitro entgegen. Normalerweise wird heute die in vitro-Synthese von Murein mit Hilfe der cytoplasmatischen Vorstufen Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin, Uridin-diphosphat-N-Acetylmuramyl-pentapeptid und partikulären Membran- oder Zellwandpräparationen gemessen (36). Durch Einsatz dieser Membranpräparationen lassen sich die Testbedingungen jedoch nicht genau definieren und kontrollieren. Eine differenzierte Analyse der einzelnen membranabhängigen Schritte in der Mureinbiosynthese ist bis jetzt nicht möglich.

Die Mureinhydrolasen dagegen können mit Hilfe ihres natürlichen Substrates, des Mureins selbst oder verschiedener Muropeptide, getestet werden. Durch Auswahl eines definierten und für das jeweilige Enzym als Substrat geeigneten Muropeptids kann die Aktivität der Mureinhydrolasen spezifisch gemessen werden (26, 36, 37, 38). Für Escherichia coli ist eine ganze Reihe verschiedener Mureinhydrolasen bekannt, die sich nach ihrer Spezifität in zwei Gruppen einteilen lassen (Tabelle 1). Einige dieser Mureinhydrolasen sind biochemisch und genetisch recht gut untersucht (Tabelle 1), trotzdem ist in keinem Fall die biologische Funktion im Detail bekannt. Über die generelle Funktion der Mureinhydrolasen bei Zellwachstum und Zellteilung ist schon gesprochen worden. Nur durch genaue Untersuchungen der Eigenschaften der einzelnen Enzyme und durch das Studium ihres Zusammenwirkens in Wildstämmen und Mutanten kann zum Verständnis der in vivo Funktionen dieser Enzyme beigetragen werden.

Tabelle 1: Mureinhydrolasen in Escherichia coli.

Mureinhydrolasen, die in der Zuckerkette spalten	Lokalisierung	Substrate	Penicillin-Hemmbarkeit	Molekulargewicht	Gen-Locus	Referenzen
Transglykosylase	löslich	Murein	nein	65 000	-	20, 39-41
Transglykosylase	membrangeb.	Murein	nein	35 000	-	41, 42
Lysozym*	membrangeb.	Murein	nein	-	-	43, 44
β-N-Acetylglucosaminidase	löslich	Disaccharid-Muropeptide	nein	36 000	-	45, 46
Mureinhydrolasen, die in der Peptidseitenkette spalten						
Carboxypeptidase IA	membrangeb.	UDP-Muramyl-pentapeptid	ja PBP 5	42 000	pfv, 14 Min dacA 13,7 Min	36, 47-52
DD-Endopeptidase/ Carboxypeptidase IB	membrangeb.	UDP-Muramyl-pentapeptid Murein, C3	ja PBP 4	49 000	dacB 68 Min	37, 47, 49, 53-55
DD-Endopeptidase	löslich	Murein, C3	nein	30 000	-	56-59
Carboxypeptidase II	löslich	C6, X' Lactyltetrapeptid	nein	86 000 (2 x 43 000)	-	26, 60, 61
Amidase	löslich	Monomere Muropeptide	nein	39 000	ami 2,1 Min	26, 38, 62-65
Lactyl-Enzym*	löslich	Monomere Muropeptide	nein	-	-	

* Enzyme, deren Existenz nicht eindeutig nachgewiesen wurde

Penicillin – Bindeproteine . Wie bereits erwähnt, greifen Penicilline und auch andere ß-Lactam-Antibiotika in den Mureinstoffwechsel ein (66, 67, 68). Versuche mit verschiedenen Penicillin-Derivaten oder verschiedenen Konzentrationen von Penicillin G zeigten, daß es wenigstens zwei Wirkorte geben muß (13, 69). Die sehr frühe Beobachtung, daß Penicillin irreversibel an die Zellhülle der Bakterien bindet, eröffnete einen experimentellen Zugang, die Wirkorte und die Wirkungsweise des Penicillins zu untersuchen (70). Diese Untersuchungen führten einerseits zur Entdeckung der Penicillin-Bindeproteine 1 - 6 (71-74). Auf der anderen Seite wurden gegen Penicillin sensitive Enzyme des Mureinstoffwechsels gefunden. Für E.coli wurden die Carboxypeptidase IA und die DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB als Penicillin-sensitive Enzyme beschrieben (47, 37). Diese beiden Enzyme konnten den Penicillin-Bindeproteinen 4 bzw. 5 zugeordnet werden (48-55). Für die Penicillin-Bindeproteine 1a, 1b, 2 und 3 ließ sich bisher keine enzymatische Aktivität nachweisen. Eine wichtige Hilfe bei der Charakterisierung der Penicillin-Bindeproteine sind die für alle Penicillin-Bindeproteine isolierten Mutanten von Escherichia coli (48, 49, 51, 54, 69, 75, 76) sowie die verschiedenen ß-Lactam-Antibiotika, die in Escherichia coli unterschiedliche physiologische und morphologische Veränderungen bewirken. Aus Untersuchungen mit diesen verschiedenen Mutanten und den verschiedenen ß-Lactam-Antibiotika wird vermutet, daß die Penicillin-Bindeproteine 1a, 1b, 2 und 3 wichtige Funktionen während des Vorgangs des Zellwachstums und der Zellteilung haben, wogegen die Rolle, die die Penicillin-Bindeproteine 4, 5 und 6 im Mureinstoffwechsel und bei der Penicillin-induzierten Lyse der Zelle spielen, noch ungeklärt ist (69, 73, 75). Im Folgenden sind die bekannten Daten für die Penicillin-Bindeproteine 1 - 6 zusammengestellt:

PBP 1: Molekulargewicht 91 000 (69). PBP 1 kann elektrophoretisch in zwei Bindeproteine, 1a und 1b, getrennt werden, die Produkte verschiedener Gene ponA (73,5 Minuten auf dem E.coli-Chromosom) bzw. ponB (3,3 Minuten auf dem

E.coli-Chromosom) sind (49). Die Penicillin-Bindeproteine 1a und 1b scheinen sich in ihren Funktionen ersetzen zu können. Mutanten in ponA oder ponB alleine sind lebensfähig, während Doppelmutanten letal sind (49). Bei PBP $1b^-$ Mutanten kommt es zu einer Überempfindlichkeit der Zellen gegen Cephaloridin und Cephalothin.

PBP 2: Molekulargewicht 66 000 (69). PBP 2 bindet als einziges der Penicillin-Bindeproteine Mecillinam und scheint vor allem für die Erhaltung der Stäbchenform von E.coli verantwortlich zu sein (73). Mutanten, denen das PBP 2 fehlt (Gen: rodA, 14,4 Min), bilden ebenso wie Wildtypzellen unter Einwirkung von Mecillinam runde Zellen; PBP 2-Mutanten sind Mecillinam-resistent.

PBP 3: Molekulargewicht 60 000 (69). PBP 3 zeigt höhere Affinität für Ampicillin und Benzyl-Penicillin als die Penicillin-Bindeproteine 1a, 1b, oder 2 und scheint für die Bildung des Septums und somit für die Zellteilung unerläßlich zu sein. Mutanten mit defektem PBP 3 wachsen als Filamente. Das Gen ftsI wurde bei 1,8 Minuten auf dem E.coli-Chromosom lokalisiert (49). Ampicillin und Benzyl-Penicillin führen in den niedrigsten wirksamen Dosen ebenfalls zur Filamentbildung beim Zellwachstum (13).

PBP 4: Molekulargewicht 49 000 (55). Das PBP 4 in Escherichia coli ist mit der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB identisch (47, 54, 55). Der Nachweis gelang nur indirekt, da das gereinigte Enzym seine Eigenschaft , Penicillin zu binden, verloren hatte. In für das PBP 4 defekten Mutanten konnte auch keine DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB nachgewiesen werden. Die Mutanten zeigen bei gleicher Penicillin-Empfindlichkeit eine erhöhte Toleranz für Penicillin-induzierte Lyse (55). Das Gen dacB wurde bei 68 Minuten auf dem E.coli-Chromosom lokalisiert (54); $dacB^-$-Mutanten besitzen eine normale Stäbchenform. Weil auch die Wachstumsrate der Mutanten normal ist, wurde vermutet, daß dieses Bindeprotein keine wichtige Funktion im Mureinstoffwechsel hat. Der Nachweis einer zweiten, Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase läßt die Möglichkeit offen, daß dieses Enzym die Funktion

der in der Mutante ausgefallenen Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase übernimmt (54, 59).

PBP 5/6: Molekulargewicht 42 000 bzw. 40 000 (48). Diese beiden Penicillin-Bindeproteine wurden zunächst als D-Alanin-Carboxypeptidase IA identifiziert (48-50). Die gereinigte Carboxypeptidase IA wies im SDS-Polyacrylamid-Gel ebenfalls eine Doppelbande auf (47, 48). Das für die enzymatische Aktivität kodierende Gen (dacA) wurde bei 13,7 Minuten kartiert (49). In neuen Arbeiten gibt es Hinweise darauf, daß diese beiden Penicillin-Bindeproteine doch verschiedene Proteine sind und daß nur das PBP 5 (pfv; 14,0 Min) identisch mit der D-Alanin-Carboxypeptidase IA ist (51, 52).

Abkürzungen.

BSA	Rinderserum-Albumin
cpm	Impulse pro Minute
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dpm	D,L-α,ε-Diaminopimelinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
MG	Molekulargewicht
PBP	Penicillin-Bindeprotein
Poly A	Polyadenylsäure
Poly G	Polyguanylsäure
Poly I·C	Polyinosin-cytidylsäure
Poly U	Polyuridylsäure
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100

II Material und Methoden

Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Escherichia coli PA 3092 Dpm. Für die präparative Reinigung wurde der E.coli K 12 Stamm PA 3092 Dpm verwendet (77, 78). Dieser Stamm ist genetisch folgendermaßen charakterisiert: F^-, dpm, thr, leu, trp, his, thyA, argH, thi, $lacy_1$, malA/λ^r, mtl, mel, tonA, $supE^+$, str, lys, B_1, xyl. Gezüchtet wurde unter Belüftung bei 37°C in Nutrient Broth Medium (Difco) 8 g/l, Natriumchlorid 5 g/l, Lysin 20 mg/l, Dpm 4 mg/l, Thymin 50 mg/l. Die Zellen wurden bei einer OD_{578}^{1cm} von 0,6 - 0,7 (4-5 x 10^8 Zellen/ml) in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und bei -70°C gelagert.

Escherichia coli W 173-25/7. Mureinsacculi und Muropeptide wurden aus dem E.coli Stamm W 173-25/7 (W7) isoliert (37). Dieser Stamm wurde durch Mutagenisierung von E.coli W 173-25 abgeleitet (79) und enthält keine Dpm-Decarboxylase (80). Genetisch charakterisiert ist der Stamm wie folgt: lys, dpm. Gezüchtet wurde bei 37°C unter Belüftung in Minimal-citrat-Glucose Medium (80) mit Zusatz von Lysin 20 mg/l, Dpm 2 mg/l. Geerntet wurde wie für E.coli PA 3092 beschrieben.

Substrate

Unmarkierte Sacculi. Aus frisch gezüchteten oder bei -70°C gelagerten Zellen wurden Mureinsacculi im wesentlichen nach der Methode von Mardarowicz isoliert (81). Die Zellen wurden in Wasser resuspendiert (0,2 g Zellen/ml), in kochende SDS-Lösung langsam eingepumpt (Endkonzentration 4 % SDS) und noch 15 Min gekocht. Die Sacculi wurden mehrmals bei Raumtemperatur mit Aqua bidest gewaschen und jeweils 1 Stunde bei 65 000 x g abzentrifugiert. Zur Abspaltung eines im Murein eingeschlossenen Glykogens wurden die Sacculi mit Amylase verdaut (82), anschließend wiederum in SDS-Lösung gekocht und gewaschen bis die Sacculi frei von SDS waren (SDS-Bestimmung Seite 21).

Zur Abspaltung des an das Murein kovalent gebundenen Lipoproteins wurden die Sacculi mit Trypsin oder Pronase verdaut (83).

Die Mureinkonzentration der gereinigten Sacculi-Suspension wurde über die Bestimmung der Dpm-Konzentration berechnet (Seite 21).

^{3}H-Dpm markierte Sacculi. Der Stamm PA 3092 Dpm wurde in Medium mit ^{3}H-Dpm (10 mCi ^{3}H-Dpm/l, 45 Ci/mMol) und unmarkierter Dpm (1,5 mg/l) gezüchtet. Die Isolierung der Sacculi erfolgte nach der für die unmarkierten Sacculi beschriebenen Methode. Für Standard-Hydrolasentests wurden radiomarkierte Sacculi mit unmarkierten Sacculi auf eine spezifische Aktivität von 2,5 x 10^6 cpm/mg Murein und eine Konzentration von 0,5 mg Murein/ml eingestellt. Zur Gewinnung von ^{3}H-Dpm markierten Muropeptiden wurden die Sacculi vor der Lysozymspaltung mit Amylase und Pronase verdaut.

Sacculi für Elektronenmikroskopie. Eingefrorene Zellen des Stammes W7 wurden mit 4 %iger SDS-Lösung wie oben beschrieben behandelt. Nach Auswaschen des SDS wurden die Sacculi in 50 mM Tris-HCl; pH 8,0 resuspendiert und mit Trypsin (0,25 mg/ml) über Nacht bei 37°C inkubiert (18). Die Sacculi wurden 30 Min bei 48 000 x g abzentrifugiert und anschließend in einer 4 %igen SDS-Lösung 30 Min gekocht. Nach 3maligem Waschen der Sacculi mit Aqua bidest wurden sie in 50 mM Glycin-NaOH Puffer; pH 9,0; 0,01 % SDS; 0,1 % Natriumazid resuspendiert und bei 4°C gelagert (57).

Muropeptide. Der Mureinsacculus wird durch Lysozym in die Muropeptide C3/C4, C5/C6 und wenig X/X' zerlegt (19). Der molekulare Aufbau dieser Muropeptide ist in Abbildung 3B wiedergegeben.
Zur präparativen Herstellung von ^{3}H-Dpm-markierten und unmarkierten Muropeptiden wurden Sacculi nach Amylase- und Pronase-Verdauung mit Lysozym gespalten (43). Die gereinigten Sacculi (2 mg Murein/ml) wurden mit Lysozym (200 µg/ml) in 50 mM Ammoniumacetat; pH 6,9 und 0,02 % Natriumazid für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz kurz aufgekocht und der Überstand nach Zentrifugation (30 Min bei 50 000 x g) lyophilisiert. Das getrocknete Material wurde in Aqua bidest aufgenommen, abzentrifugiert (30 Min bei 50 000 x g) und der klare Überstand über eine Sephadex G 25f-Säule in die monomeren Muropeptide C5/C6 und die dimeren Muropeptide C3/C4 aufgetrennt. Der Nachweis der Muropeptide in den einzelnen Fraktionen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (Seite 20). Eine weitere Auftrennung in einzelne Muropeptide wurde durch Papierchromatographie erreicht (Seite 20) (43, 84). Bei der Reinigung von ^{3}H-Dpm-markierten Muropeptiden wurden die Fraktionen mit Hilfe einer Isotopen-Kamera (Zinsser, Frankfurt) nachgewiesen.

Mureinvorstufen. Das für die spezifische Messung der DD-Carboxypeptidase notwendige Substrat UDP-N-Acetyl-Muramyl-L-Ala-D-Glu-meso-Dpm-D-Ala-^{14}C-D-Ala (9 cpm/pMol) wurde uns freundlicherweise von David Mirelman überlassen.

Mureinhydrolasentests

Transglykosylase. Die Gesamtaktivität derjenigen Mureinhydrolasen, die in der Lage sind, hochmolekulares Murein in niedermolekulare Bruchstücke zu spalten, kann mit ^{3}H-Dpm markierten Mureinsacculi als Substrat erfaßt werden. Dabei werden nach dem derzeitigen Erkenntnisstand nur die lösliche (20, 39) und die an die Membran gebundene Transglykosylase erfaßt (42).
In einem Gesamtvolumen von 100 µl (10 mM Tris-Maleat; pH 6,0; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100) wurden 5 - 30 µl Enzymlösung mit 10 µl ^{3}H-Dpm markierten Sacculi (5 µg Murein; 3 x 10^3 cpm/µg) 5 - 60 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad gestoppt und die unverdauten Sacculi durch Zugabe von 100 µl 1 %igem N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB) gefällt. Nach 15 Min im Eisbad wurden die Proben 2 Min bei 12 000 x g abzentrifugiert, vom Überstand wurden 100 µl zur Messung der Radioaktivität abpipettiert. Die gemessene Transglykosylaseaktivität wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Transglykosylase-Einheit} = \frac{\text{pMol Dpm freigesetzt}}{\text{mg Protein x Min}}.$$

Mit diesem Test wurde spezifisch Transglykosylaseaktivität getestet, wobei nach papierchromatographischer Auftrennung der Reaktionsprodukte eine Aussage über die Reinheit bzw. Verunreinigungen der Transglykosylase-Präparation durch andere Hydrolasen gemacht werden kann.

DD-Endopeptidase. DD-Endopeptidasen spalten spezifisch die Peptidbindung zwischen der ε-Aminogruppe der m-Diaminopimelinsäure und der Carboxylgruppe des D-Alanin in der Peptidbrücke des Mureins. Das dimere Muropeptid C3 wird als Substrat von den Endopeptidasen in 2 Moleküle C6 gespalten. Substrat und Produkt können papierchromatographisch oder elektrophoretisch voneinander getrennt werden (43).

In 40 µl Gesamtvolumen (10 mM Tris-Maleat; pH 6,0 für die Penicillin-insensitive Endopeptidase; pH 8,0 für die Penicillin-sensitive Endopeptidase; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100) wurden 2 - 15 µl Enzymlösung mit 350 pMol ^{3}H-Dpm markiertem Muropeptid C3 ($6{,}4 \times 10^4$ cpm/350 pMol) 5 - 60 Min bei 37°C inkubiert.

Bei Test auf Penicillin-Empfindlichkeit wurde 2×10^{-4} M Penicillin G zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Proben 3 Min gekocht, anschließend lyophilisiert, in 10 µl Wasser aufgenommen und papierchromatographisch in Substrat und Produkt aufgetrennt. Zur quantitativen Auswertung wurde die Radioaktivität im nicht umgesetzten Substrat und im Produkt bestimmt. Als Maß für die Endopeptidaseaktivität wurde der Prozentsatz an umgesetztem Muropeptid C3 benutzt.

$$\% \text{ Substrat umgesetzt} = \frac{\text{cpm Produkt} \times 100}{\text{cpm (Substrat + Produkt)}} .$$

Die spezifische Endopeptidaseaktivität wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{pMol Substrat umgesetzt}}{\text{mg Protein} \times \text{Min}} .$$

DD-Carboxypeptidase. Dieses Enzym spaltet in der Pentapeptidseitenkette des Mureins oder in der Mureinvorstufe Uridin-diphosphat-Muramylpentapeptid die Peptidbindung in der D-Alanyl-D-Alanin Endgruppe und setzt somit das endständige D-Alanin frei (85).

In einem Gesamtvolumen von 40 µl (10 mM Tris-HCl; pH 9,0; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100) wurden 5 - 15 µl Enzymlösung mit 240 pMol UDP-N-Acetyl-Muramyl-

L-Ala-D-Glu-meso-Dpm-D-Ala-^{14}C-D-Ala (5×10^3 cpm/240 pMol) 5 - 60 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen der Proben (3 Min) gestoppt und anschließend das freigesetzte D-Alanin papierchromatographisch vom Substrat getrennt (Laufzeit 12 - 14 Stunden) und über die Messung der Radioaktivität identifiziert. Die quantitative Auswertung erfolgte wie für Endopeptidase beschrieben.

LD-Carboxypeptidase. Von der Tetrapeptidseitenkette des Mureins spaltet dieses Enzym das endständige D-Alanin ab (85). Als natürliches Substrat wurde Muropeptid C6 eingesetzt, das durch Freisetzung des D-Alanins am Carboxylende in C5 umgewandelt wird.

5 - 10 µl Enzymlösung wurden mit 1 nMol ^{3}H-Dpm markiertem Muropeptid C6 (7×10^4 cpm/nMol) und Testpuffer (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100) in einem Endvolumen von 40 µl 30 - 120 Min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden 3 Min gekocht, lyophilisiert und zur Auftrennung von Substrat und Produkt auf Papierchromatogramme aufgetragen. Die quantitative Auswertung wurde wie beim Endopeptidase-Test durchgeführt.

Amidase. Die Amidase spaltet spezifisch die Peptidseitenketten vom Lactylrest der Muraminsäure ab. Als Substrat wurde das Muropeptid X' verwendet; dabei lassen sich Substrat und Produkt papierchromatographisch am besten trennen (38).

5 - 10 µl Enzymlösung wurden in 40 µl Gesamtvolumen mit 500 pMol ^{3}H-Dpm-markiertem Muropeptid X' (0,2 µCi/mMol) und Inkubationspuffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,0; 10 mM $MgSO_4$; 1 % Triton X-100) 30-120 Min bei 37°C inkubiert. Die chromatographische Auftrennung in Substrat und Produkt und die quantitative Auswertung wurde wie für Endopeptidase beschrieben durchgeführt.

Trennung von Muropeptiden

Papierchromatographie. Die Auftrennung von Muropeptiden und ihren Spaltprodukten erfolgte auf Papier SS 2040 (Schleicher & Schüll, Dassel). Die Chromatogramme wurden 12 - 24 Stunden bei 24°C absteigend entwickelt. Als Laufmittel wurde die Oberphase eines Gemisches aus n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) verwendet (43).
Für die präparative Trennung von Muropeptiden wurde das Papier Whatman 3MM (Whatman, Frankreich) benutzt, die Proben wurden wie beschrieben (84) vom Papier eluiert. Für eine gute Trennung der Muropeptide wurde eine Laufzeit von 72 Stunden benötigt.

Dünnschichtchromatographie. Bei der präparativen Isolierung von Muropeptiden wurden zur jeweiligen Analyse die Proben dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Muropeptide wurden auf Cellulose-beschichteten Glasplatten oder Plastikfolien der Schichtdicke 0,1 mm aufgetrennt (Merck, Darmstadt). Die Dünnschichtplatten wurden 5 - 12 Stunden aufsteigend in der Oberphase des Gemisches n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) entwickelt. Zur genaueren Analyse von Muropeptiden und deren Spaltprodukten wurden die Proben nach saurer Hydrolyse (Seite 21) dünnschichtchromatographisch in Aminosäuren und Aminozucker aufgetrennt. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus n-Butanol-Pyridin-Wasser-Eisessig (60 : 40 : 30 : 3) benutzt. Nach dem Lauf wurden die Platten getrocknet, mit Ninhydrin-Sprühreagenz (Merck, Darmstadt) besprüht und 10 Min bei 120°C erhitzt.

Hochspannungs-Papierelektrophorese. Mit Hilfe dieser Methode kann eine schnelle Auftrennung der Muropeptide in Monomere (C5 + C6, X + X') und Dimere (C3 + C4) und eine Abtrennung der Tri- und Tetrapeptide erreicht werden. Für dieses Trennverfahren wurde Whatman 3MM-Papier verwendet, das 15 Min in der Elektrolyt-Lösung (2 % Ameisensäure, pH 1,8) vorgequollen wurde (86). Die Proben wurden dann 12 cm vom Pluspol entfernt aufgetragen und 3 - 4 Stunden bei 60 Volt/cm aufgetrennt.

Quantitative Bestimmung der Diaminopimelinsäure. Die Konzentration von Murein oder Muropeptiden kann über die quantitative Bestimmung der Diaminopimelinsäure gemessen werden (79). Jede monomere Untereinheit des Mureins enthält eine Diaminopimelinsäure, also entspricht ein Mol Dpm einem Mol Mureinuntereinheit (Molekulargewicht 918).
Die Proben wurden 12 - 14 Stunden in 6 N HCl unter Stickstoff in zugeschmolzenen Ampullen bei 105°C hydrolysiert, anschließend unter Vakuum getrocknet und in 0,5 ml Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 ml Eisessig und 0,5 ml Ninhydrin-Reagenz (6 ml Eisessig + 4 ml 0,6 M H_3PO_4 + 250 mg Ninhydrin) wurde der Ansatz 5 Min gekocht. Die Absorption der Proben wurde bei 436 nm gegen einen Nullwert gemessen. Als Standard wurden Vergleichslösungen mit 10 - 100 nMol Dpm eingesetzt.

Bestimmung der SDS-Konzentration. Die SDS-Konzentration in wässrigen Lösungen läßt sich nach einer von Hayashi beschriebenen Methode bestimmen (87). Dabei wird nach Zugabe von Methylenblau ein SDS-Methylenblau-Komplex organisch extrahiert, während Methylenblau in der wässrigen Phase bleibt. Die Intensität der Blaufärbung der organischen Phase ist das Maß für den SDS-Gehalt der Probe. Durch Vergleich mit entsprechenden Standardproben

können SDS-Konzentrationen bis unter 1 µg/ml bestimmt werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration. Der Proteingehalt von Lösungen oder Suspensionen wurde nach der Methode von Lowry bestimmt (88). Der Nullwert wurde mit dem jeweiligen Probenpuffer angesetzt, ebenso die Standardproben (25 µg Rinderserumalbumin). In Proben mit Triton oder hohen Salzkonzentrationer tritt ein Niederschlag auf; daher wurden alle Proben 2 Min bei 12 000 x g abzentrifugiert urd die Extinktion der Überstände bei 578 nm gemessen.

Leitfähigkeitsmessung. Die Ionenstärke von Puffern und Lösungen wurde mit einem Konduktometer (Mod. LF 39 der Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim/Obb.) gemessen. Die Säulengradienten wurden direkt am Auslauf der Säule mit einer Durchfluß-Meßzelle der gleichen Firma gemessen. Beide Geräte wurden jeweils mit den entsprechenden Puffern definierter Molarität geeicht.

Messung der Radioaktivität. Proben in wässriger Lösung (0,1 - 0,3 ml) wurden in 2,5 ml Triton-Toluol Szintillator (10 g PPO in 1 l Toluol und 0,5 l Triton X-100) gemessen. Für Proben auf Papier- oder Filterscheiben wurde nach Zugabe von 0,2 ml Wasser der gleiche Szintillator benutzt. Die Proben wurden in Flüßigkeitsszintillationszählern der Firma Packard gemessen. Die Zählausbeute für ^{3}H- bzw. ^{14}C-markierte Proben betrug 17 bzw. 91 %. Radioaktive Substanzen auf Chromatogrammen wurden entweder mit einer Isotopenkamera (Birchover Instruments, England) oder mit einem Packard Radiochromatogram Scanner (Mod. 7200) lokalisiert.

Isoelektrische Fokussierung. Diese Methode wurde sowohl analytisch zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Proteinen als auch präparativ bei der Reinigung der Mureinhydrolasen eingesetzt. Als Gel-Matrix wurde entweder Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia) oder Ultrodex-Gel (LKB) im Flachbett-System LKB 2117 Multiphor verwendet. Die Vorbereitung des Gelmaterials und das Gießen des Gels wurde nach der Anleitung der Firma LKB (Application Note 198) durchgeführt. Für die Einstellung des pH-Gradienten wurden Ampholine (LKB) oder Servalyte (Serva) des pH-Bereiches 2 - 11 benutzt. Für den Lauf wurden folgende Bedingungen eingehalten: bei konstanter Spannung und 4°C, 200 Volt/14 Stunden, 400 Volt/3 Stunden. Nach dem Lauf wurden Proteinbanden nach dem Abklatschverfahren sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel mit einem Fraktionsgitter (LKB) in 30 Fraktionen geteilt und in Elutionssäulen (LKB), die unten mit einem Nylonnetz (10 µm) bespannt sind, überführt. Diese Elutionssäulen wurden in Zentrifugenröhrchen hängend jeweils 3 Min bei 5 000 Upm in der Christ-Minifuge eluiert. Zur Messung des pH-Gradienten wurde Gelmaterial der einzelnen Fraktionen in jeweils 1 ml Aqua bidest suspendiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Für die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht wurde das SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem von Lugentberg et al. (89) benutzt. Es wurden Plattengele der Stärke 1,5 mm mit einem Sammelgel (2,5 % Acrylamid) verwendet. Zur Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung isolierter Enzyme wurden Trenngele mit 10 % Acrylamid verwendet. Die Auftrennung der Penicillin-bindenden Proteine erfolgte in Trenngelen mit 6,5 % Acrylamid (76). Elektrophoriert wurde in einem Gerät der Firma Hölzel-Technik, Dorfen/Obb.. Die Proben wurden 45 Min bei einer konstanten Stromstärke von 12,5 mA im Sammelgel konzentriert

und dann 3 - 4 Stunden bei 24 mA aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 Min gefärbt (1,25 g Coomassie brilliant blue R 250, 454 ml 50 %iges Methanol, 46 ml Eisessig) und anschließend entfärbt (75 ml Eisessig, 50 ml Methanol, 875 ml Wasser) (90).

Proben wurden wie folgt vorbereitet: Je nach Reinigungsstufe und Proteingehalt wurden 20 - 2 000 µl Probelösung (5 - 200 µg Protein) lyophilisiert und anschließend mindestens 3 Stunden mit 500 µl 10 %iger Trichloressigsäure im Eisbad gefällt. Das Sediment wurde 1mal mit 500 µl 10 %iger Trichloressigsäure und 3mal mit je 200 µl Aceton/0,1 N HCl gewaschen (91). Abzentrifugiert wurde jeweils 4 Min bei 12 000 x g. Die Proben wurden getrocknet und in Probenpuffer nach Lugtenberg (89) aufgenommen, 3 Min gekocht und auf das Gel aufgetragen.

Als Eichproteine wurden folgende Proteine eingesetzt:

	Molekulargewichte
RNA-Polymerase (E.coli)	
Untereinheiten	
β'	165 000 (o)
β	155 000 (o)
α	39 000 (o)
Phosphorylase b	94 000 (*)
Rinderserum-Albumin	68 000 (o,*)
Albumin aus Hühnerei	43 000 (o,*)
Carboanhydrase	30 000 (*)
Chymotrypsinogen	25 000 (o)
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	20 100 (*)
α-Lactalbumin	14 400 (*)

(* Electrophoresis Calibration Kit, Pharmacia. o Combithek, Boehringer)

Radiomarkierung von Penicillin-Bindeproteinen. Nach der von Spratt ausgearbeiteten Methode (73) ist es möglich, die in der Cytoplasmamembran vorhandenen Penicillin-bindenden Proteine mit Hilfe von ^{14}C-Penicillin G spezifisch zu markieren. Die Proteine werden dann über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die radiomarkierten Banden durch Fluorographie auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Die Radiomarkierung Penicillin-bindender Proteine in Membranpräparaten wurde nach Spratt (73) durchgeführt. Bei Proteinlösungen wurde die Methode abgewandelt: Salzhaltige Proteinlösungen (20 - 2 000 µg/ml Wasser) wurden gegen salzfreien Puffer (10 mM) dialysiert. Von einzelnen Aufarbeitungsstufen wurden je nach Reinheitsgrad 5 - 500 µg Protein mit 20 µl ^{14}C-Penicillin G (50 µCi/ml) 20 Min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 20 %iger Sarkosyl- und 5 µl Penicillin G-Lösung (12 mg/100 µl Wasser) wurden die Proben 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10 %) 2 Stunden im Eisbad gefällt. Die Präzipitate wurden wie auf Seite 15 beschrieben gewaschen, und anschließend in 50 µl 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8, 3 % SDS, 30 % Glycerin, 0,002 % Bromphenolblau und 10 µl Merkaptoäthanol aufgenommen, 3 Min gekocht, auf das Gel (Seite 23) aufgetragen und fraktioniert. Zur Lokalisierung der einzelnen Penicillin G-bindenden Proteinbanden wurden 10 - 40 µl (6 µg Protein/µl) eines radiomarkierten Membranextraktes als Standard aufgetragen.

Fluorographie. Die angefärbten Gele wurden nach Bonner und Laskey (92) 2 x 30 Min in jeweils 400 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) unter leichter Bewegung entwässert, und anschließend mit Szintillator-Lösung (80 ml 20 % (w/w) PPO in DMSO) 2 Stunden imprägniert. Nach Absaugen der PPO-DMSO-Lösung wurde der Szintillator im Gel mit 400 ml Wasser (1 Stunde) ausgefällt. Anhaftende PPO-Kristalle wurden abgewaschen und das Gel auf Whatman MM3 Papier

unter Vakuum getrocknet. Ein mit Blitzlicht vorbelichteter Röntgenfilm (Kodak RP Royal X-Omat) wurde bei -70°C auf dem getrockneten Gel 5 - 20 Tage exponiert.

Enzymatische Verdauung von Mureinsacculi für Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Von der gereinigten löslichen Transglykosylase und der Penicillin-insensitiven Endopeptidase wurden Proben lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt. Für Versuche wurden die Enzyme jeweils in 50 µl Puffer (10 mM Tris-Maleat, pH 6,0, 10 mM $MgSO_4$, 0,2 % Triton X-100) aufgenommen. Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma, St. Louis) wurden in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml gelöst.

Die Mureinsacculi wurden auf die Trägernetzchen gespreitet. Hierzu wurden Formvar-beschichtete Netzchen mit der beschichteten Seite nach unten auf einen 50 µl Tropfen Sacculi-Suspension für 1 Min aufgelegt. Die Netzchen wurden mit Filterpapier getrocknet und zweimal auf einem Tropfen 50 mM Glycin-NaOH-Puffer (pH 9,0) gewaschen. Die Netzchen wurden mit Filterpapier, dann an der Luft getrocknet. Die mit Mureinsacculi beladenen Netzchen wurden auf einem Tropfen Enzymlösung verschieden lange bei 37°C inkubiert (93) und anschließend auf 4 Tropfen 50 mM Glycin-NaOH-Puffer (pH 9,0) jeweils 5 Min gewaschen. Schließlich wurden die Netzchen mit Filterpapier und an der Luft getrocknet.

Kontrastierung und Elektronenmikroskopie. Zur positiven Kontrastierung wurden die Netzchen für 1 Min auf einen Tropfen wässriger 1 %iger Uranylacetat-Lösung gelegt und anschließend mit Filterpapier und an der Luft getrocknet. In einigen Fällen wurden die Netzchen mit Platin/Palladium unter einem Winkel von 6° rotationsbedampft. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden entweder mit einem Philips EM 300 oder mit einem Siemens 102 A Elmiskop Mikroskop gemacht.

Chemikalien.

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, in der höchsten erhältlichen Reinheit bezogen.

Aminosäuren	Serva, Heidelberg
Bromycan, reinst	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R250, rein	Serva, Heidelberg
Diaminopimelinsäure	Calbiochem/Päsel, Ffm.
D,L-meso-Diaminopimelinsäure (4-^{3}H(N)), 45 Ci/mMol, 96 % rein	CIS, Frankreich
DNA aus Kalbsthymus, Typ V	Sigma, München
DNase I, E.C. 3.1.4.5., lyophil. rein, aus Rinderpankreas	Serva, Heidelberg
Lysozym, E.C. 3.2.1.17., 3 x krist. reinst, aus Hühnereiweiß	Serva, Heidelberg
Penicillin G, Kaliumsalz, pharm. 1590 E/mg	Serva, Heidelberg
Polyadenylsäure · K-Salz lyophil., reinst	Sigma, München
Polyguanylsäure · K-Salz lyophil., rein	Sigma, München
Polyinosinsäure-cytidylsäure · K-Salz kopolymer lyophil., reinst	Sigma, München
Polyuridylsäure · K-Salz lyophil., reinst	Sigma, München
Pronase P, E.C. 3.4.24.4. lyophil., reinst, aus Streptomyces griseus, 45 PUK/mg	Serva, Heidelberg
Triton X-100, prakt.	Serva, Heidelberg
Trypsin, E.C. 3.4.4.4. 2 x krist., aus Rinderpankreas	Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio.

III Ergebnisse und Diskussion

Teil 1

Reinigung und Charakterisierung einer neuen Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase

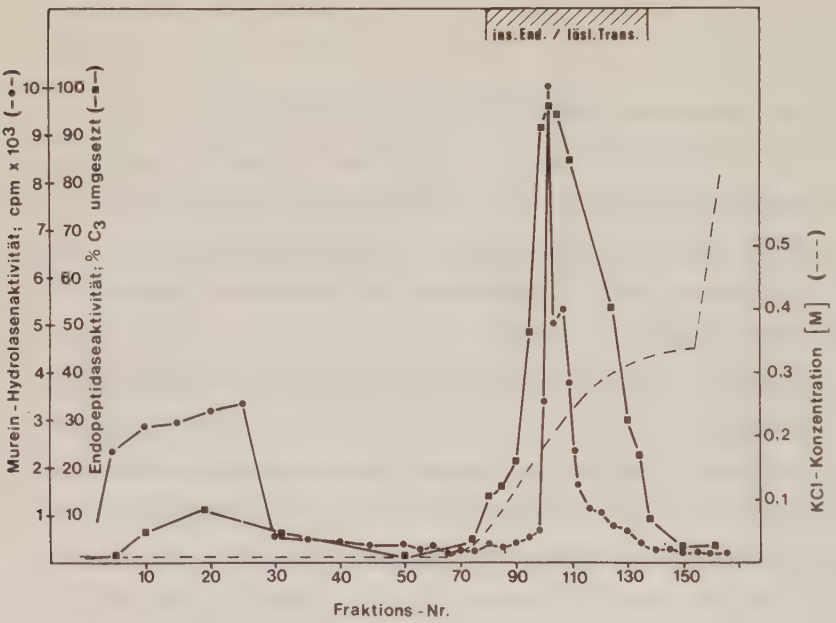
Während der Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase (Ergebnis-Teil 3) war eine neue DD-Endopeptidase gefunden worden, deren Aktivität durch Penicillin G nicht gehemmt werden konnte (53). Durch diese Eigenschaft gehört diese Endopeptidase in die Gruppe der Hydrolasen, die für die Penicillin-induzierte Lyse der Zellen verantwortlich sein könnten. Zum besseren Verständnis seiner biologischen Funktion in der Zelle sollte dieses Enzym gereinigt und charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war es, diese Endopeptidase nach vollständiger Abtrennung von anderen Mureinhydrolasen für Untersuchungen der Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus zu nutzen (Ergebnis-Teil 2).

Zellaufschluß. Ausgangsmaterial für die Reinigung der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase waren Zellen von E.coli PA 3092 (Wachstumsbedingungen siehe Seite 14). Die Zellen (200 g Feuchtgewicht) wurden aufgetaut und in 500 ml Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 6,8; 10 mM $MgSO_4$) mit 40 µg DNase/ml resuspendiert. Jeweils 100 ml der Bakteriensuspension wurden mit 240 g Glasperlen (Durchmesser: 0,17 - 0,18 mm; Braun Melsungen) 15 Min unter Eiskühlung in einer Bühler-Zellmühle (Bühler, Tübingen) geschüttelt (11). Nach Abtrennen der Glasperlen (Nylongewebe, 5 µm Maschenweite) und Abzentrifugation der Zellhüllen (60 Min bei 48 000 x g) wurde der Oberstand

gegen 3 x 5 l Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (30 Min bei 28 000 x g) und der Überstand (500 ml) über eine CM-Sepharose Säule weiter gereinigt.

Chromatographie über CM- und DEAE-Sepharose. Der Überstand nach Dialyse (500 ml) wurde auf eine mit dem Dialysepuffer äquilibrierte CM-Sepharose Säule aufgepumpt. Nicht bindendes Material wurde mit Äquilibrierpuffer ausgewaschen und die Säule anschließend mit einem Salzgradienten eluiert (Legende Abb. 4). Endopeptidase-Aktivität eluierte in einem breiten Gipfel zwischen 0,1 und 0,3 M KCl, während die Transglykosylase-Aktivität in einem recht scharfen Gipfel bei 0,2 M KCl gemessen wurde (Abb. 4). Die Endopeptidase-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach Dialyse gegen Tris-Maleat Puffer über eine mit dem Dialysepuffer äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule (2,6 x 40 cm; 212 ml; Fließgeschwindigkeit 33 ml/h) weiter fraktioniert. Sowohl die Endopeptidase als auch die Transglykosylase wurden mit 80 % Ausbeute im Durchlauf wiedergefunden. Der vereinigte Durchlauf wurde in einer Druckdialysezelle (PM 10 Membran, Amicon) auf 28 ml eingeengt und gegen 2 x 2 l Puffer (10 mM Kaliumphosphat; pH 7,0; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert und für die weitere Reinigung über Poly-U Sepharose verwendet.
In einigen Aufarbeitungen wurden beide Enzyme schwach an die DEAE-Sepharose gebunden und in einem gemeinsamen Gipfel bei 50 mM KCl wieder eluiert. In diesen Fällen wurde bei diesem Reinigungsschritt keine gute Anreicherung der beiden Enzyme erreicht.

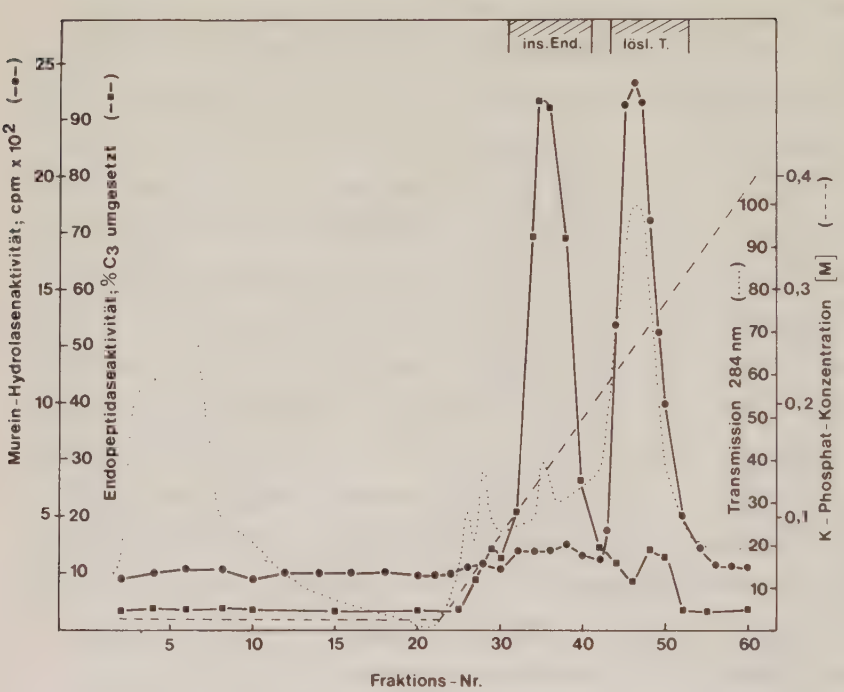
Abbildung 4: Chromatographie eines Rohextraktes über CM-Sepharose.



Auf eine mit 10 mM Tris-Maleat; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 0,1 mM Dithioerythrit äquilibrierte CM-Sepharose CL-6B Säule (Pharmacia; 2,6 x 31 cm; 165 ml, 32 ml/Std.) wurde der Rohextrakt nach Dialyse gegen Äquilibrierpuffer (500 ml; 7 250 mg Protein) aufgepumpt. Nach Waschen der Säule mit Äquilibrierpuffer (Fraktionen: 35 Min) wurde mit einem Gradienten aus 380 ml Äquilbrierpuffer und 320 ml 0,5 M KCl in Äquilibrierpuffer eluiert und anschließend mit 1 M KCl in Äquilibrierpuffer nachgewaschen (Fraktionen: 15 Min). Transglykosylase- und Endopeptidaseaktivität wurde wie beschrieben gemessen (Seite 17). Die Endopeptidase-haltigen Fraktionen 80 - 138 wurden vereinigt, gegen 3 x 5 l Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 8,0; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert und der Überstand nach Zentrifugation (30 Min bei 28 000 x g) für die weitere Reinigung über DEAE-Sepharose verwendet.

Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose. Die weitere Reinigung der Penicillin insensitiven DD-Endopeptidase wurde durch die Bildung eines relativ stabilen Komplexes zwischen dieser Endopeptidase und der löslichen Transglykosylase erschwert. Sowohl bei Ionenaustauscher- Chromatographie und Chromatographie über Hydroxylapatit als auch bei isoelektrischer Fokussierung ließen sich die beiden Enzyme nicht voneinander trennen (siehe Diskussion). Die reversible Bindung der Endopeptidase an Poly-Uridinsäure (Abb. 9) ermöglichte es, die Endopeptidase durch Affinitätschromatographie an Poly U-Sepharose weiter zu reinigen. Das nach Chromatographie über DEAE-Sepharose dialysierte Enzymkonzentrat wurde auf eine Poly U-Sepharose 4B Säule aufgepumpt. Die Säule wurde mit Dialysepuffer äquilibriert und nicht bindendes Material mit Äquilibrierpuffer ausgewaschen. Transglykosylase- und Endopeptidaseaktivität wurden mit einem linearen Kaliumphosphat-Gradienten eluiert. Die Abbildung 5 zeigt eine vollständige Trennung der beiden Enzyme. Im Vergleich zum Rohextrakt wurde die Endopeptidase etwa 20 000fach angereichert. Dieser sehr hohe Reinigungsfaktor läßt sich vielleicht durch geringe Mengen an aktivitätshemmenden Oligonukleotiden, die trotz Desoxyribonuklease-Behandlung im Rohextrakt noch vorhanden waren, erklären (Seite 28).

Abbildung 5: Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose.



Die über CM- und DEAE-Sepharose vorgereinigte Endopeptidase und die gleichzeitig angereicherte Transglykosylase wurden nach Dialyse gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,1 mM Dithioerythrit) durch Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose 4B (Pharmacia) weiter gereinigt. Die mit dem Dialysepuffer äquilibrierte Säule (0,6 x 8 cm; 2,3 ml; 10 ml/Std.) wurde mit dem Enzym beladen (28 ml; 1,96 mg Protein), mit Äquilibrierpuffer gewaschen und mit einem linearen Gradienten aus 100 ml Äquilibrierpuffer und 100 ml des gleichen Puffers (1 M Kaliumphosphat) eluiert. Die beiden Enzymaktivitäten wurden wie auf Seite 17 und 18 beschrieben gemessen. Fraktionen: 1 - 20 je 30 Min, dann je 15 Min. Die Endopeptidase enthaltenden Fraktionen wurden gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert und für die Charakterisierung der Endopeptidase verwendet.

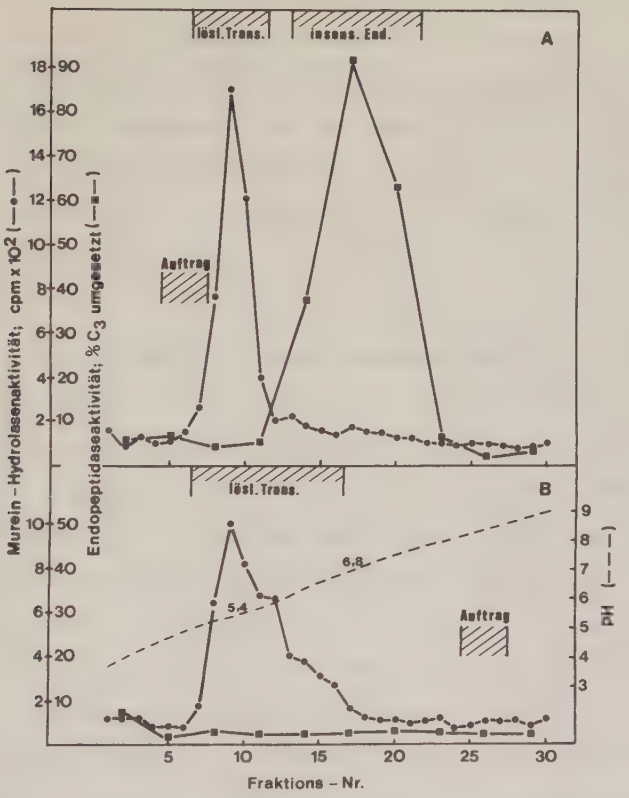
Tabelle 2: Reinigung der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase

Reinigungsstufe	Gesamtvolumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Spezifische Aktivität	Ausbeute	Reinigungs-Faktor
Rohextrakt	500	7 250	5,4	100	1
CM-Sepharose Säule	425	413	118	125	22
DEAE-Sepharose Säule nach Einengung	28	1,96	10 800	54	2 000
Poly U-Sepharose Säule	12,5	0,164	113 000	47	20 900

Die einzelnen Reinigungsschritte sind im Text beschrieben. Die Endopeptidaseaktivität wurde getestet wie auf Seite 18 beschrieben. Die Enzymaktivität wurde in Einheiten angegeben (eine Einheit entspricht dem Umsatz von 1 pMol Substrat pro mg Protein per Minute bei 37°C.

Isoelektrische Fokussierung. Sowohl zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes als auch zur präparativen Reinigung der Endopeptidase wurde diese Methode eingesetzt. Je nach Vorreinigung der Enzymlösung variierte die Ausbeute an wiedergefundener Endopeptidase nach isoelektrischer Fokussierung zwischen 0 und 30 %. Bei sehr guter Vorreinigung und vor allem bei vorheriger Abtrennung der Transglykosylase konnten zwar distinkte Proteinbanden angefärbt, in den meisten Fällen aber keine Endopeptidaseaktivität mehr gemessen werden. Enthielt die Auftragslösung beide Enzymaktivitäten, konnte nicht immer eine klare Trennung der beiden Aktivitäten, wie sie in Abbildung 6A dargestellt ist, erreicht werden. In einigen Fällen wurde im Endopeptidase-Gipfel auch Transglykosylaseaktivität gemessen. Dieser Transglykosylase-Gipfel entspricht der im Teil 4 beschriebenen membrangebundenen Transglykosylase. Unterschiedliche Ergebnisse wurden auch beim Auftragen in unterschiedlichem pH-Bereich erhalten. Die Abbildung 6 zeigt, daß beim Auftragen im sauren pH-Bereich eine gute Trennung der beiden Enzyme möglich war, während beim Auftragen im basischen pH-Bereich die Endopeptidaseaktivität nach der Fokussierung nicht wiedergefunden werden konnte. Die Transglykosylase erreichte dagegen unabhängig vom Auftragspunkt die gleiche Position im pH-Gradienten. Das Verhalten der Endopeptidase kann verschiedene Ursachen haben. Die Endopeptidase könnte in basischer Umgebung denaturieren und so ihre Aktivität verlieren oder sie könnte mit den basischen Ampholinen Komplexe bilden und zur Kathode aus dem Gel wandern, wie für einige Proteine beschrieben (94, 95). Beim Auftragen im sauren Bereich wurde reproduzierbar ein isoelektrischer Punkt von 6,8 für die Endopeptidase gefunden (Abb. 6).

Abbildung 6: Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase und der löslichen Transglykosylase.



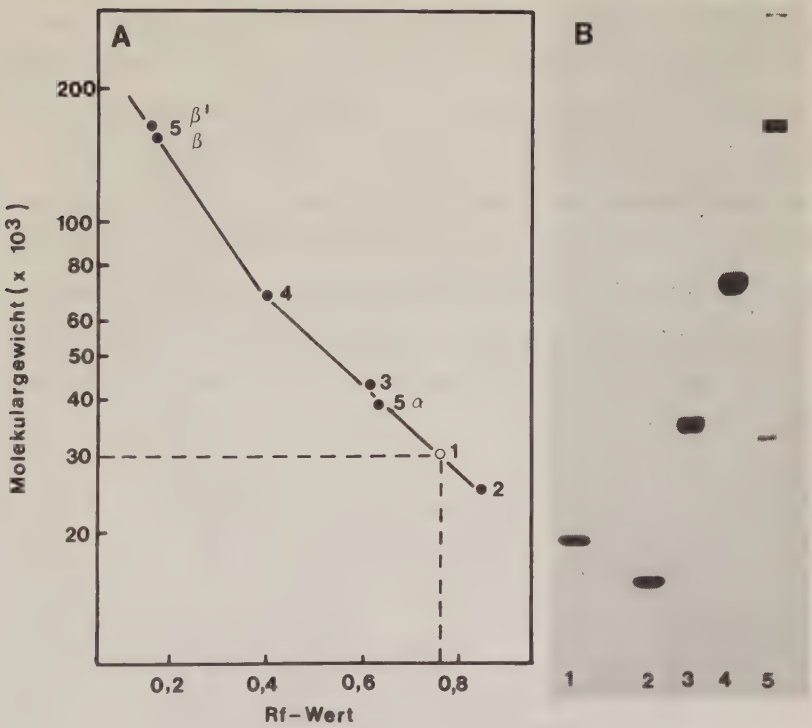
Auf ein granuliertes Flachbett-Gel (Ultrodex-Gel, LKB) wurde eine über CM- und DEAE-Ionenaustauscher-Säulen vorgereinigte Probe mit Transglykosylase- und Endopeptidaseaktivität aufgetragen. Es wurden 2 Parallelproben (jeweils 250 µl mit 0,2 mg Protein) in der Nähe der Anode bzw. Kathode aufgetragen. Die Gelvorbereitung wurde nach den Angaben der Firma LKB durchgeführt (Application note 198). Für die Einstellung des pH-Gradienten wurden Ampholine des pH-Bereichs 2-11 verwendet (Endkonzentration 5 %). Das Gel enthielt 0,1 mM Dithioerythrit. Der Lauf wurde bei konstanter Spannung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 200 Volt /12 Stunden, 400 Volt/2,5 Stunden, 600 Volt/7 Stunden. Alle Fraktionen wurden auf Transglykosylaseaktivität getestet (siehe Seite 17). Jeweils 3 Fraktionen zusammen (je 5 µl Enzymlösung) wurden wie auf Seite 18 beschrieben auf Endopeptidaseaktivität gemessen.

Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung. Zur Überprüfung der Reinheit der von der Poly U-Sepharose-Säule eluierten Endopeptidase und zur Bestimmung des Molekulargewichtes dieses Enzymproteins wurden im SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System von Lugtenberg et al (89) die Endopeptidase und Eichproteine aufgetrennt (Seite 23). Die Enzymproben wurden wie auf Seite 24 beschrieben vorbereitet. Wie die Abbildung 7B zeigt, konnte die Endopeptidase mit dem hier beschriebenen Reinigungsverfahren bis zur Homogenität gereinigt werden. Das Molekulargewicht der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase liegt wie aus Abbildung 7A ersichtlich bei 30 000 ($\pm$ 2 000).

Hemmung der Endopeptidase durch ß-Lactam Antibiotika. Die Insensitivität dieser DD-Endopeptidase gegenüber Penicillin G war das erste Kriterium, nach dem die Penicillin-insensitive Endopeptidase von der bis dahin bekannten Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase I B unterschieden werden konnte (53). Während der Reinigung wurde diese Eigenschaft zur eindeutigen Identifizierung des Enzyms ausgenutzt. Die Hemmbarkeit der hochgereinigten DD-Enodpeptidase durch verschiedene ß-Lactam Antibiotika wurde getestet. In einem Gesamtvolumen von 40 µl wurden 2 µl Endopeptidase (Abb. 5 Frkt. 36) wie auf Seite 18 beschrieben mit jeweils 100 µg/ml der ß-Lactam Antibiotika 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Endopeptidase konnte in Gegenwart von Penicillin G, Ampicillin, Cephaloridin, Mecillinam, Cefoxitin und Piperacillin bis zu einer Konzentration von je 100 µg/ml nicht gehemmt werden.

Hemmung der Endopeptidase durch DNS, Polynukleotide und Heparin. Die gereinigte Penicillin-insensitive DD-Endopeptidase wurde auf ihre Hemmbarkeit durch DNS, Polynukleotide und Heparin getestet. Die Endopeptidase wurde für diese Versuche mit Rinderserum-Albumin (170 µg/ml Enzymlösung)

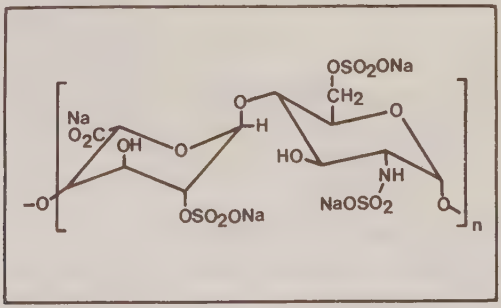
Abbildung 7: Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.



Auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel (89) wurden gereinigte Endopeptidase (2,3 µg Protein, Frkt. 35, Abb. 5) und Eichproteine (je 2 µg Protein) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. (1) Endopeptidase (Molekulargewicht 30 000); (2) Chymotrypsinogen (Molekulargewicht 25 000); (3) Ovalbumin (Molekulargewicht 43 000); (4) Rinderserum-Albumin (Molekulargewicht 68 000); (5) RNA-Polymerase (Molekulargewicht ß' 165 000, ß 165 000, α 39 000). Die Rf-Werte der Proteine sind auf die Laufstrecke von Bromphenolblau bezogen.

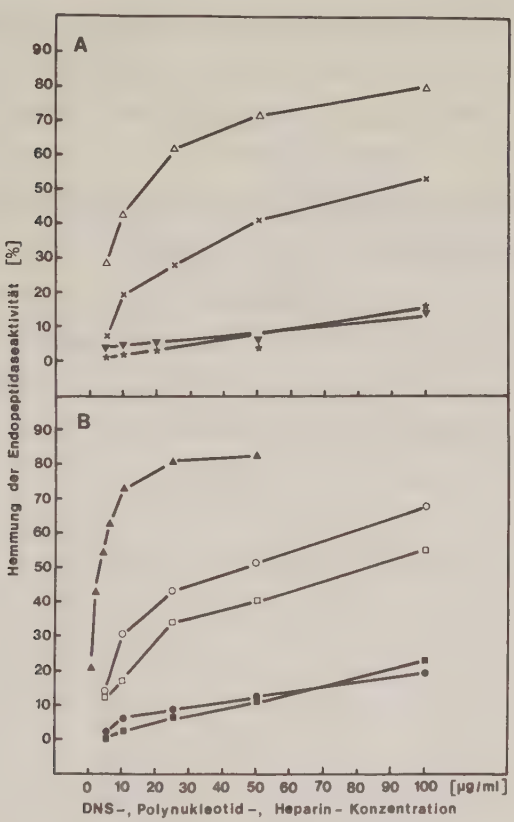
stabilisiert. Bei Verwendung von nicht stabilisierter Endopeptidase traten große Schwankungen in der gemessenen Enzymaktivität auf. Die DNS und die Polynukleotide wurden in 115 mM NaCl; 15 mM Na-citrat; pH 7,0, Heparin wurde in Aqua bidest gelöst. Zur Gewinnung von Einzelstrang-DNS wurde die DNS-Lösung 5 Minuten auf 100°C erhitzt und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt. Wie Abbildung 9A, B zeigt, wird die Endopeptidase durch Einzelstrang-DNS oder Polynukleotide gut gehemmt, während doppelsträngige DNS oder Polynukleotide (Poly I·C) die Aktivität nur wenig hemmen. Eine Ausnahme scheint Polyadenylsäure darzustellen; jedoch bildet dieses Polynukleotid bei saurem pH Doppelstränge (96). Die Hemmung der Endopeptidaseaktivität durch Heparin läßt sich durch seinen polyanionischen Charakter, der dem der Nukleinsäuren ähnlich ist, erklären. Heparin bindet ebenfalls an verschiedene Nukleinsäure-Polymerasen, wahrscheinlich durch Kompetition mit der Nukleinsäure um die Bindestelle (97, 98, 99).

Abbildung 8: Chemische Struktur des Heparin-Disaccharids.



Heparin ist ein lineares Mucopolysaccharid, das hauptsächlich aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten aus α-L-Idopyranuronsäure 2-sulfat und 2-Desoxy-2-sulfamino-α-D-glucopyranose 6-sulfat besteht, die α 1,4 glykosidisch miteinander verknüpft sind (Abbildung nach: Pharmacia, Heparin-Sepharose CL-6B for affinity chromatography).

Abbildung 9: Hemmung der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidaseaktivität durch DNS, Polynukleotide und Heparin.



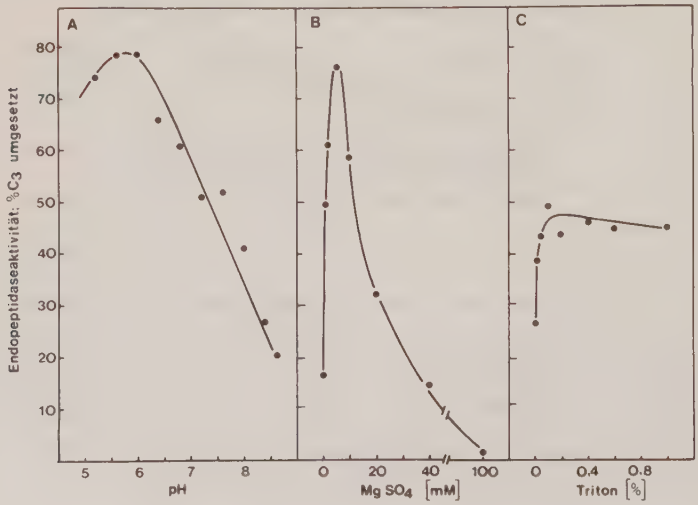
Die Endopeptidaseaktivität wurde im wesentlichen wie auf Seite 18 beschrieben getestet. In 40 µl Gesamtvolumen (10 mM Tris-Maleat; pH 6,0; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100) wurden 5 µl Substrat (^{3}H-Dpm Muropeptid C3, Endkonzentration 8,75 µM, 6,4 x 10^4 cpm/350 pMol) und jeweils 20 µl Lösung der Hemmstoffe mit 5 µl gereinigter Endopeptidase 30 Minuten bei 37°C inkubiert. (A) Polyuridylsäure (—△—); Polyguanylsäure (—x—); Polyadenylsäure (—▼—); Polyinosin-cytidylsäure (—*—). (B) DNS aus Kalbsthymus, Doppelstrang (— ● —) und Einzelstrang (— o —); DNS aus Rinder-Lymphozyten Doppelstrang (—■—) und Einzelstrang (—□—); Heparin (—▲—).

pH-Optimum, Mg^{2+}- und Triton-Abhängigkeit der Endopeptidaseaktivität. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Endopeptidaseaktivität vom pH, der Mg^{2+}- und Triton X-100-Konzentration des Inkubationspuffers wurde die gereinigte Endopeptidase gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert und anschließend die Aktivität unter verschiedenen Bedingungen mit dem Muropeptid C3 als Substrat bestimmt (Seite 18).

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde der Inkubationspuffer (10 mM Tris-Maleat) auf pH-Werte zwischen 5,2 und 8,6 eingestellt.

Die Mg^{2+}-Abhängigkeit der Endopeptidaseaktivität wurde im Konzentrationsbereich 0-100 mM $MgSO_4$ bestimmt. Die Abbildung 10B zeigt ein im Vergleich zu anderen Mureinhydrolasen scharfes Aktivitätsoptimum der Endopeptidase bei 5 mM Mg^{2+}. Die Abhängigkeit von Triton X-100 wurde durch Variation der Triton-Konzentration zwischen 0 - 1 % bestimmt.

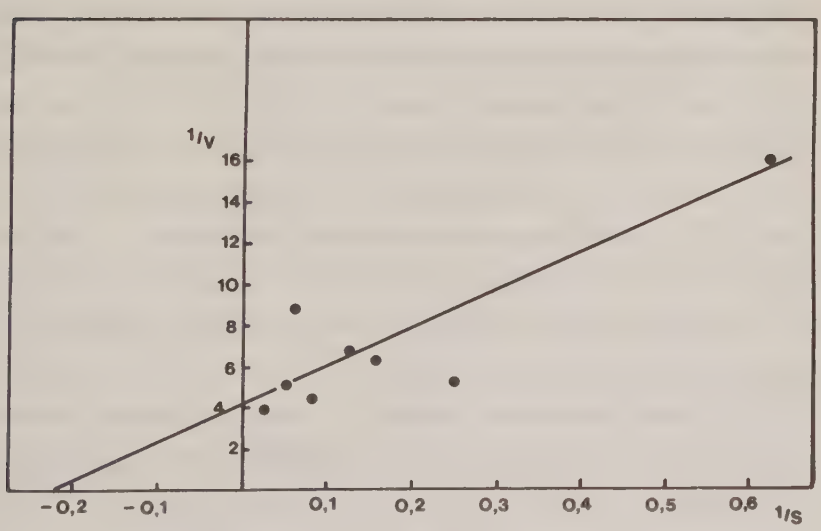
Abbildung 10: pH-Optimum, Mg^{2+}- und Triton-Abhängigkeit.



In einem Gesamtvolumen von 40 µl wurden 2 µl Endopeptidase (Abb. 5 Frkt. 36, 0,027 µg Protein in 2 µl) mit 350 pMol ^{3}H-Dpm markiertem Muropeptid C3 (6,4 x 10^4 cpm/350 pMol) und Tris-Maleat-Puffer (10 mM) mit verschiedenen pH-Werten, Mg^{2+}- und Triton-Konzentrationen jeweils 8 Minuten bei 37°C inkubiert.

Bestimmung der Michaelis – Konstante. Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante der löslichen DD-Endopeptidase wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion mit hochgereinigtem Enzym (Poly U-Sepharose-Säule, Abb. 5 Frkt. 36) gemessen. Endopeptidase wurde gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert und anschließend wie in der Legende zu Abbildung 11 beschrieben mit steigenden Substratkonzentrationen inkubiert. Aus der Darstellung der Ergebnisse in einem Lineweaver-Burk Diagramm ergibt sich eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} von 0,41 pmol/mg Protein x Min und eine Michaelis-Konstante K_M von 4×10^{-6} M.

Abbildung 11: Bestimmung von V_{max} und der Michaelis-Konstante nach Lineweaver und Burk.



In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 2 µl Endopeptidase (0,03 µg Protein) mit steigenden Substratkonzentration (1,6 - 40 µM C3) und Inkubationspuffer (10 mM TM; pH 6,0; 10 M $MgSO_4$; 0,? % Triton X-100) 10 Min bei 37°C inkubiert. Die quantitative Bestimmung der Endopeptidaseaktivität wurde wie auf Seite 18 beschrieben durchgeführt. Substratkonzentration S = M x 10^{-6}, Reaktionsgeschwindigkeit V = pmol/mg x Min.

Substrate. Für das Verständnis der biologischen Funktion der Endopeptidase ist es wichtig, möglichst genaue Auskunft über die strukturellen Eigenschaften der von ihr akzeptierten Substrate zu erhalten. Für die im Ergebnis-Teil 2 der Arbeit beschriebenen Versuche zur Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus war es unbedingt erforderlich zu wissen, ob hochmolekulares Murein, das heißt ganze isolierte Sacculi, als Substrat akzeptiert werden. Deshalb wurden mit den uns zur Verfügung stehenden Substraten (ganze Sacculi und das Muropeptid C4) Tests durchgeführt. Im Gegensatz zur Transglykosylase setzt die Endopeptidase aus intaktem Murein keine - nach Fällung mit CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid) - löslichen Muropeptide frei. Die von ihr aus dem Murein durch Spaltung der Peptidbrücken freigesetzten Zuckerketten werden mit CTAB ausgefällt. Nur über eine quantitative Bestimmung der Peptidbrücken im - als Substrat eingesetzten - Murein kann die Endopeptidaseaktivität bestimmt werden. Nach papierchromatographischer Auftrennung der Lysozym-Spaltprodukte kann anhand des Anteils an dimeren Muropeptiden die Quervernetzung im Murein bestimmt werden (100). Ausgehend von einem Murein mit einer ursprünglichen Quervernetzung von 27 % konnten die Peptidbrücken bis auf 2,5 - 3 % Quervernetzung gespalten werden. Dabei zeigte sich, daß das im Murein vorhandene C4 im Vergleich zu C3 nur sehr viel langsamer umgesetzt wurde. Die Penicillin-insensitive DD-Endopeptidase ist also in der Lage, die Peptidbrücken im intakten Murein zu spalten.

Testansätze, in denen gereinigtes Muropeptid C4 als Substrat eingesetzt wurde (Testansatz wie Seite 18 mit anschließender Lysozymverdauung), bestätigten, daß die Peptidbrücke im Muropeptid C4 von der Endopeptidase gespalten wird.

Diskussion . Die Reinigung und Charakterisierung der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase wurde durchgeführt, um etwas über ihre mögliche Funktion zu erfahren, und um dieses Enzym bei Untersuchungen über die Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus einsetzen zu können (siehe Ergebnis-Teil 2). Dies erforderte eine Abtrennung aller anderen Mureinhydrolasen. Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Reinigungsverfahren konnte die DD-Endopeptidase bis zur Homogenität gereinigt werden. Die gegenüber dem Rohextrakt erreichte 20 000-fache Anreicherung des Enzyms erscheint sehr hoch und könnte durch eine Hemmung der Endopeptidaseaktivität im Rohextrakt durch - trotz DNase-Behandlung vorhandener - Oligonukleotide erklärt werden. Auch die nach dem ersten Reinigungsschritt erhaltene Ausbeute von über 100 % deutet auf eine Inhibition der Endopeptidaseaktivität im Rohextrakt hin. Die für die weitere Nutzung der DD-Endopeptidase geforderte Abtrennung von anderen Hydrolasen sollte sich als das bei der Reinigung schwierigste Problem erweisen. Die DD-Endopeptidase konnte wie bereits erwähnt durch konventionelle Methoden nicht von der löslichen Transglykosylase abgetrennt werden. Beide Enzyme scheinen einen relativ stabilen Komplex zu bilden. Erst durch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der beiden Enzyme für Einzelstrang-DNS oder Polynukleotide war es möglich, beide Enzyme durch Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose klar voneinander zu trennen (Abb. 5). Heparin, ein Mucopolysaccharid mit einem der Einzelstrang-DNS ähnlichen polyanionischen Charakter hemmt ebenfalls die Aktivität beider Enzyme und kann nach kovalenter Bindung an Sepharose zur Trennung dieser Enzyme verwendet werden.

Während der Ausarbeitung der Reinigungsmethode für diese Penicillin-insensitive DD-Endopeptidase wurde von Matsuhashi et al. (54) in einer für das Penicillin Bindeprotein 4 (DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB) defekten Mutante eine gegen Penicillin G insensitive DD-Endopeptidaseaktivität gemessen. Dieses Enzym wurde partiell gereinigt (380-fache Anreicherung) und

die Hemmbarkeit seiner Aktivität durch DNS beschrieben (58). Ob es sich bei diesem Enzym um die von uns gereinigte und charakterisierte DD-Endopeptidase handelt, kann nach den bis jetzt bekannten Daten nicht entschieden werden. Von Iida wurden Mutanten mit einem Defekt der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase isoliert. Diese Mutanten weisen recht hohe, durch Penicillin nicht hemmbare Restaktivitäten auf. In den voneinander unabhängig isolierten Mutanten wurden die mutierten Gene an zwei, sich auf dem Chromosom gegenüberliegenden Loci kartiert (unveröffentlichte Ergebnisse). Dies könnte bedeuten, daß es zwei Enzyme dieser Spezifität gibt, die durch Penicillin nicht gehemmt werden. Mit der hier beschriebenen Reinigungsmethode ist es möglich, die für die Restaktivität in den Mutanten verantwortlichen Enzyme zu reinigen und zu prüfen, ob es zwei voneinander verschiedene Penicillin-insensitive DD-Endopeptidasen gibt.

Die von uns gereinigte DD-Endopeptidase unterscheidet sich von der bereits beschriebenen DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB (47, 54 , 55) durch ihre Insensitivität gegenüber ß-Lactam Antibiotika. Darüber hinaus konnte keine DD-Carboxypeptidaseaktivität mit dem gereinigten Enzym gemessen werden.

Die Frage nach der eigentlichen biologischen Funktion der hier beschriebenen Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase läßt sich bis jetzt ausgehend von folgenden Befunden nur spekulativ beantworten: Das Enzym akzeptiert intakte Mureinsacculi als Substrat. Die Zuckerketten im Sacculus sind vorwiegend parallel zur Teilungsebene der Zelle ausgerichtet (57, siehe Ergebnis-Teil 2). Während der Septumbildung bei normaler Zellteilung wird das Mureingerüst durch begrenzte hydrolytische Aktivität in der Teilungsebene aufgelockert (13, siehe auch Abb. 12). Der Sacculus wird in intakten Zellen in Gegenwart von Penicillin durch eine topologisch streng kontrollierte hydrolytische Aktivität in der Teilungsebene geschnitten (13). Diese hydrolytische Aktivität muß insensitiv gegenüber Penicillin sein. Aufgrund all dieser Befunde erscheint es möglich, der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase eine Aufgabe in den sehr komplexen Vorgängen während der Zellteilung zuzuschreiben.

Teil 2

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus

Zum molekularen Aufbau des Mureins und der Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus wurden verschiedene Modelle beschrieben (10,101-104). Die bisher durchgeführten Untersuchungen ließen keine eindeutige Aussage über die Orientierung der Zuckerketten im Mureinsacculus zu. Die Kenntnis der Feinstrukturierung des Mureinsacculus könnte jedoch dazu beitragen, die Veränderungen des Mureins während des Wachstums und der Teilung der Bakterien, sowie die topologische Kontrolle der am Mureinstoffwechsel beteiligten Enzyme, besser zu verstehen.
Nach Reinigung der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase war es möglich, mit Hilfe dieses Enzyms die Peptidbrücken zwischen den Zuckerketten spezifisch zu spalten. Auf diese Weise sollte sich die Struktur des Mureins ohne Veränderung der Zuckerketten so auflockern lassen, daß eventuell eine Feinstrukturierung des Mureins im Elektronenmikroskop sichtbar wird. Als Kontrolle wurden Verdauungen der Sacculi mit Enzymen (Lysozym und Transglykosylase), die in der Zuckerkette spalten, durchgeführt.

Präparation der Sacculi. Für die Strukturuntersuchungen wurden Sacculi aus E.coli W7 wie auf Seite 15 beschrieben isoliert. Bei den Verdauungsexperimenten mußten die Sacculi bereits vor der enzymatischen Verdauung auf den Netzchen gespreitet werden (Seite 26). Versuche, die Sacculi in Suspension mit den Enzymen zu verdauen und anschließend auf den Träger-

film zu spreiten, schlugen fehl. Das verdaute Material aggregierte, so daß elektronenoptische Beobachtungen der Feinstruktur nicht mehr möglich waren. Abbildung 12a zeigt unbehandelte Sacculi, die keinerlei Strukturierung erkennen lassen. Beim Kollabieren der Sacculi auf dem Trägerfilm treten an den Polkappen meist Falten auf. Da die Inkubationszeiten mit den Enzymen in einigen Experimenten mehrere Stunden betrug, wurden Sacculi zur Kontrolle 3,5 Stunden mit 50 mM Glycin-NaOH Puffer (pH 9,0) bei 37°C inkubiert. Abbildung 12b zeigt, daß auch diese Sacculi keine Strukturierung erkennen lassen.

Inkubation mit Endopeptidase. Die Voraussetzung für die Verwendung der DD-Endopeptidase zur definierten Spaltung der Peptidbrücken im Murein war die vollständige Abtrennung anderer hydrolytischer Aktivitäten, besonders der Transglykosylaseaktivität. Dies wurde mit dem im Ergebnis-Teil 1 beschriebenen Reinigungsverfahren erreicht (Abb. 5 und 6). Für die Inkubation der Sacculi mit DD-Endopeptidase wurden die saubersten Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung (Abb. 6) verwendet. Von diesen Fraktionen wurden Proben lyophilisiert und bei -20°C gelagert. Vor dem Versuch wurden die Enzymproben in 50 µl Aqua bidest und 5 µl 10fach konzentriertem Tris-Maleat-Puffer (100 mM; pH 6,0; 100 mM $MgSO_4$; 2 % Triton X-100) aufgenommen. Die Verdauung und das anschließende Waschen und Kontrastieren der auf den Trägernetzchen gespreiteten Sacculi wurde wie auf Seite 26 beschrieben durchgeführt.

Das Ergebnis dieser Verdauung mit Endopeptidase zeigen die Abbildungen 12c und 12d. Der Sacculus zeigt nun eine aufgelockerte, netzähnliche Struktur aus Fasern, die vorzugsweise quer zur Längsachse der Zelle orientiert sind. Es sollte nicht vergessen werden, daß bei den gespreiteten Sacculi zwei Mureinschichten übereinander liegen. Diese Überlagerung der beiden Netzstrukturen erschwert die Interpretation der beobachteten Strukturen. Die

Dicke der Fasern schwankt zwischen 4 - 15 nm. Zwei benachbarte Zuckerketten können nach Braun et al. (14) bei maximaler Entfaltung der Peptidbrücken in einem Abstand von 4,2 nm liegen. Bei maximaler Faltung beträgt der Abstand 1 nm. Die Zuckerketten selbst haben einen Durchmesser von 1,1 nm. Die beobachteten Fasern bestehen wahrscheinlich aus Bündeln einzelner Zuckerketten.

Inkubation mit Transglykosylase oder Lysozym. Als Kontrollexperimente wurden Sacculi mit Enzymen, die in der Zuckerkette spalten, inkubiert. Das Murein soll durch teilweise Spaltung der glykosidischen Bindungen aufgelockert werden. Im Gegensatz zu den mit DD-Endopeptidase verdauten Sacculi sollten diese keine fasrigen Strukturen aufweisen. Für die Verdauung der Sacculi mit Transglykosylase wurde ebenfalls ein hochgereinigtes Enzympräparat verwendet. Proben der Gipfelfraktionen (Abb. 5) wurden lyophilisiert, bei -20°C gelagert, und wie für die Endopeptidase beschrieben in Puffer aufgenommen. Die Verdauungsreaktion, das Waschen und die anschließende Kontrastierung der Sacculi wurde wie auf Seite 26 beschrieben durchgeführt. Untersuchungen der Wirkungsweise der Transglykosylase haben gezeigt (41), daß dieses Enzym wahrscheinlich als Exoenzym die Zuckerketten vom nicht reduzierenden Ende her in die Muropeptide X/X' und X-Dimere spaltet. Die mit diesem Enzym verdauten Sacculi zeigen keine vorzugsweise Orientierung des zurückbleibenden Materials (Abb. 13). Die Transglykosylase fängt an, zunächst kleine Löcher in das Murein zu schneiden, die mit länger werdender Inkubationsdauer größer werden. Sehr schnell geht dabei auch die Stäbchenform des Sacculus verloren (Abb. 13a, b), während bei den mit Endopeptidase verdauten Sacculi die Form sehr lange erhalten bleibt. Das als Endoenzym in den Zuckerketten spaltende Hühnereiweiß-Lysozym (EC 3.2.1.17; grade I, Sigma, St. Louis, Mo.) wurde für weitere Kontroll-

Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mureinsacculi.

a) Gereinigte gespreitete Sacculi, wie sie für die Verdauungsexperimente ausgesucht wurden. Dieses Präparat wurde mit Uranylacetat kontrastiert und anschließend mit Platin/Palladium rotationsverdampft (6^{o}).

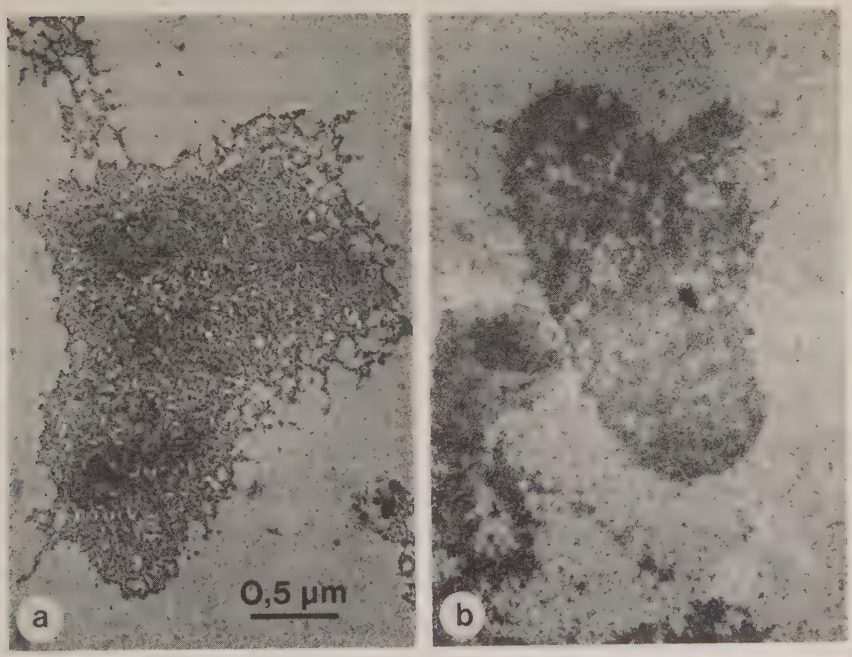
b) Sacculi, die 3,5 Stunden bei 37^{o}C in Puffer (10 mM Tris-Maleat; pH 6,0; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % TX-100) inkubiert wurden. Kontrastiert wurde wie in a).

c) Sacculi, die 3 Stunden mit Endopeptidase behandelt wurden, Kontrastierung mit Uranylacetat.

d) Sacculi, die ebenfalls 3 Stunden mit Endopeptidase behandelt wurden. Kontrastierung mit Uranylacetat.

verdauungen der Sacculi verwendet. Das lyophilisierte Lysozym wurde in Tris-HCl Puffer (50 mM; pH 7,6) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml gelöst. Das Verdauungsexperiment selbst wurde wie für die beiden anderen Enzyme beschrieben durchgeführt. Auch nach nur teilweiser Verdauung der Sacculi mit Lysozym konnte wie bei den Experimenten mit Transglykosylase keine geordnete Struktur beobachtet werden; es treten Löcher auf, die im Verlauf der Inkubationszeit größer werden, bis sich schließlich der Sacculus auflöst.

Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mureinsacculi.



a) Sacculi, die 15 Min bei 37°C mit Transglykosylase inkubiert wurden. Kontrastiert wie bei Abb. 12a.

b) Sacculi, 10 Min lang mit Lysozym bei 37°C inkubiert. Kontrastierung wie bei Abb. 12a.

Diskussion. Nach partieller Spaltung der Peptidbrücken in gespreiteten Sacculi mit Hilfe der gereinigten DD-Endopeptidase war im Elektronenmikroskop eine lockere, netzartige Strukturierung der Sacculi zu sehen. Die Fasern dieses Netzes hatten eine vorzugsweise, quer zur Längsachse der Zelle ausgerichtete Orientierung (Abb. 12c, d)- im Gegensatz zu den Vergleichsexperimenten mit Transglykosylase oder Lysozym.

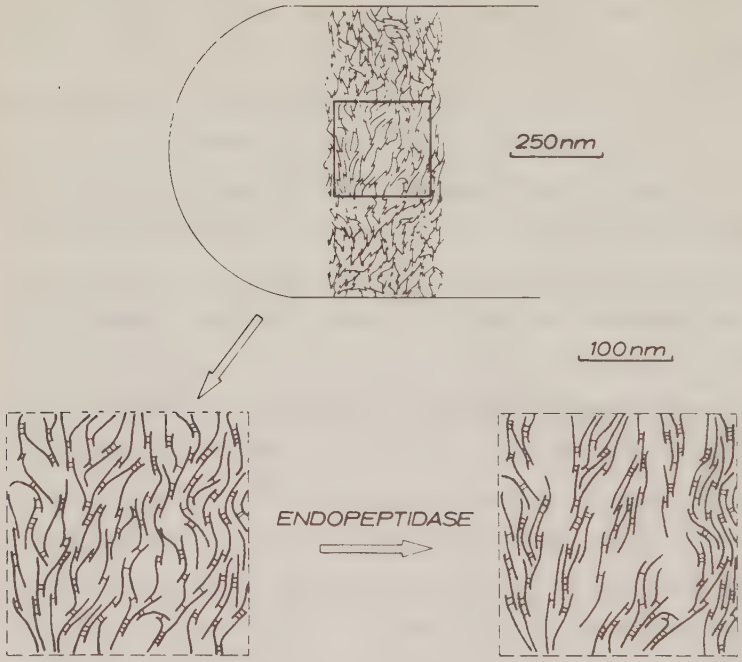
Leider ist es nicht möglich, den Grad des Abbaus der Sacculi auf den Netzchen quantitativ zu bestimmen. Die mit den Enzymen in den Standardtests gemessene Hydrolyse der Sacculi ließ sich nicht auf die Verdauungen der auf Netzchen gespreiteten Sacculi übertragen. Die Inkubationsbedingungen auf den Netzchen können nicht völlig kontrolliert werden. Es wurden bei Einhaltung gleicher Bedingungen auf verschiedenen Netzchen und sogar in verschiedenen Feldern des gleichen Netzchens unterschiedliche Verdauungsstadien der Sacculi beobachtet.

Aus den elektronenmikroskopischen Abbildungen der mit Endopeptidase verdauten Sacculi lassen sich keine detaillierten Aussagen über die Feinstruktur des Mureingerüstes ableiten. Erkennbar jedoch ist eine Ausrichtung der Zuckerketten quer zur Längsachse der Zelle. Die in unseren Abbildungen erkennbaren Fasern können das Ergebnis einer sekundären Um- und Aneinanderlagerung der nach Spaltung der Peptidbrücken freier beweglichen Zuckerketten sein (Abb. 14). Aufgrund dieser Beobachtungen und unter Berücksichtigung der aus anderen Untersuchungen bekannten strukturellen Eigenschaften des Mureins nehmen wir eine in Abbildung 14 schematisch dargestellte Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus an. Die Zuckerketten haben eine durchschnittliche Länge von 35 - 50 Disaccharid-Untereinheiten; das entspricht einer Gesamtlänge von 35 - 50 nm (15, 16, 22). Die Peptidseitenketten sind zu ungefähr 30 % quervernetzt (17). Die Peptidbrücken erlauben den Zuckerketten einen Abstand zwischen 1 und 4,2 nm (14). Für die in unserer schematischen Darstellung ungleiche Verteilung der Peptidbrücken entlang der Zuckerketten gibt es eben-

falls experimentelle Hinweise. Die Markierung des N-Acetylglucosamin-Endes der Zuckerketten durch ^{14}C-D-Galaktose mit Hilfe der Galaktosyltransferase und anschließender Lysozymverdauung zeigte, daß ^{14}C-D-Galaktose markierte Spaltprodukte stärker quervernetzt sind als der Durchschnitt aller Spaltprodukte (16).

Unser Modell zur Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus wird von anderen in der Literatur beschriebenen Beobachtungen unterstützt. Burge und Mitarbeiter schlugen nach Untersuchungen mit Röntgenstrukturanalysen und Komputermodellen eine ähnliche, lockere Anordnung der Zuckerketten im Murein vor (Abb. 9a in der Referenz 105). Aus Bacillus subtilis isolierte Sacculi zeigten nach begrenzter Verdauung mit Amidase eine ähnliche Strukturierung des Mureins (106). Eine Anordnung der Zuckerketten quer zur Längsachse der Zelle wurde auch aus dem nach Uranylacetat-Behandlung von Spirillum serpens-Sacculi erhaltenen Schrumpfungsmuster abgeleitet (101). Sacculi von Bacillus subtilis wiesen auch ohne eine Kontrastierung mit Uranylacetat eine Streifung auf (104). Bei unseren Kontrollexperimenten konnte mit Sacculi von E.coli nach Kontrastierung mit Uranylacetat weder eine Schrumpfung noch eine Streifung beobachtet werden. Mit Ultraschall behandelte Sacculi von E.coli zeigten Brüche, die wiederum quer zur Längsachse der Zelle verlaufen (107). Isolierte Sacculi von E.coli-Zellen, die in Gegenwart von Penicillin gezüchtet wurden, zeigten einen scharfen Schnitt, der durch eine topologisch kontrollierte Murein-Hydrolasenaktivität verursacht wird (13). Mit der hier vorgeschlagenen Anordnung der Zuckerketten läßt sich auch die bei normalem Wachstum sehr genaue Einhaltung des Zelldurchmessers erklären. Der Einbau von neuen Zuckerketten in den wachsenden Sacculus führt bei konstant gehaltenem Durchmesser zu einer Verlängerung der Zelle. Die geordnete Struktur des Mureingerüsts kann auch eine wichtige Voraussetzung für die topologische Kontrolle der Mureinhydrolasen und -synthetasen darstellen.

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus von E.coli.



Im oberen Teil der Abbildung ist die von uns vorgeschlagene Anordnung der Zuckerketten im Mureinsacculus dargestellt. Es wurde versucht, alle bekannten Struktureigenschaften des Mureins zu berücksichtigen. Die Zuckerketten sind im Vergleich zum Zelldurchmesser (ca. 1 µm) in maßstäblicher Länge (35 - 50 nm) gezeichnet. Der untere Teil der Abbildung zeigt im vergrößerten Ausschnitt das Mureingerüst vor und nach Verdauung mit Endopeptidase (57).

Teil 3

Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB und Identifizierung des Enzyms als Penicillin-Bindeprotein 4

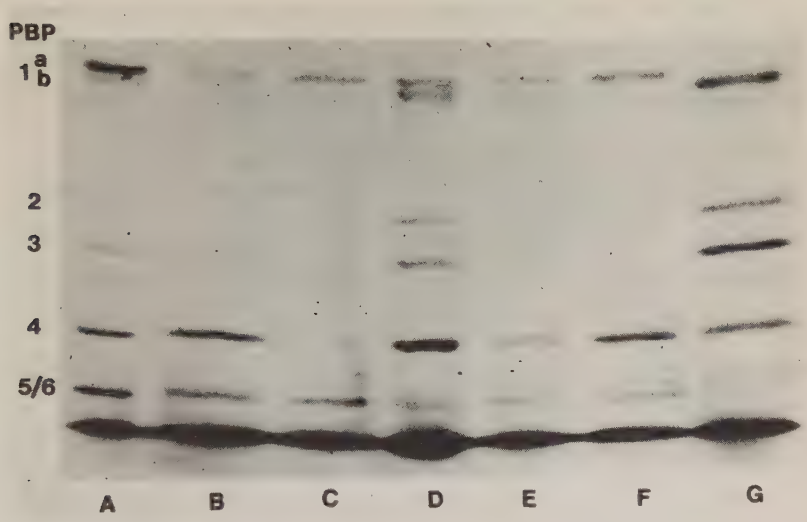
Noch immer sind trotz intensiven Studiums die Vorgänge bei der Zellteilung und beim Längenwachstum der Bakterien nicht völlig verstanden. Eine Möglichkeit, diese Vorgänge auf molekularer Ebene zu untersuchen, bietet die Verwendung von spezifischen Hemmstoffen. Mit den Penicillinen und Cephalosporinen stehen für die Zellteilung spezifische Hemmstoffe zur Verfügung. Die Identifizierung der Angriffspunkte dieser Hemmstoffe sollte einen Einblick in die für die Zellteilung wichtigen Prozesse geben.

Die Suche nach dem Angriffsort von Penicillin in Bakterien führte einerseits zur Entdeckung der durch Penicillin hemmbaren Mureinhydrolasen (36, 37, 47), andererseits wurden mehrere Penicillin-bindende Proteine in der Cytoplasmamembran nachgewiesen (71, 73, 74). Die Penicillin-sensitiven Enzyme wurden gereinigt und charakterisiert (37, 47, 53), die gereinigte Carboxypeptidase IA wurde zunächst als Penicillin-Bindeproteine 5/6 identifiziert (48). Mutanten, denen die Carboxypeptidase IA-Aktivität fehlte, hatten allerdings nach wie vor die Penicillin-Bindeproteine 5/6 (49-51). Von Hirota et al. wurde kürzlich eine Mutante isoliert, der sowohl die Carboxypeptidase IA als auch das PBP 5 fehlt (52). Für die Penicillin-sensitive Endopeptidase/Carboxypeptidase IB konnte nur indirekt gezeigt werden, daß es sich wahrscheinlich um das Penicillin-Bindeprotein 4 handelt. Die von Tamura et al. gereinigte DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB (Molekulargewicht 41 000) zeigte zwar noch durch Penicillin hemmbare enzymatische Aktivität, konnte aber kein Penicillin binden (47).

Mehreren voneinander unabhängig isolierten Mutanten fehlten sowohl das Penicillin-Bindeprotein 4 (Molekulargewicht 49 000) als auch die DD-Endopeptidase /Carboxypeptidase IB (54, 55).

Zellaufschluß und Membranextraktion. Für die Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase wurden 200 g eingefrorene Zellen von E.coli PA 3092 aufgetaut und wie im Teil 1 beschrieben aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellhüllen in einem Endvolumen von 200 ml Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2) sorgfältig resuspendiert und dann mit dem gleichen Volumen dieses Puffers mit 20 mM EDTA; 1 M NaCl; 4 % Triton X-100 aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 2 Stunden bei $4^{o}C$ gerührt. Die extrahierten Zellhüllen wurden abzentrifugiert (60 Min bei 48 000 x g) und der Überstand (335 ml) gegen 2 x 7 l Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert. Die Extrahierung der membrangebundenen Enzyme bei einem pH-Wert von 5,2 erwies sich als sehr wichtig, da sonst bei der anschließenden Dialyse des Rohextraktes ein Teil der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase (PBP 4) präzipitierte und deshalb verloren ging (Abbildung 15). Um eine gute Ausbeute an Endopeptidase nach Dialyse zu erhalten, war es ebenso wichtig, eine Triton-Konzentration von 2 % beizubehalten. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (30 Min bei 28 000 x g) und der Überstand (350 ml) zur ersten Anreicherung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase auf eine CM-Sepharose-Säule aufgepumpt.

Abbildung 15: Penicillin-Bindeproteine im Membranextrakt.



Um mit einer möglichst guten Ausbeute an PBP 4 die Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase zu beginnen, wurde die Extraktion der Membranen und die anschließende Dialyse des Rohextraktes bei verschiedenen Bedingungen durchgeführt. (A) Penicillin-Bindeproteine aus E.coli-Membranen nach Spratt (73) zur Markierung der Positionen der einzelnen Bindeproteine. (B) Extraktion von Membranen mit Tris-Maleat Puffer pH 6,8 (10 mM; 10 mM EDTA; 0,5 M NaCl; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit). (C) Überstand nach Dialyse des Rohextraktes (B) gegen Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 6,8; 10 mM $MgSO_4$; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit). (D) Bei der Dialyse des Rohextraktes (B) ausgefallene Bindeproteine. (E) Extraktion von Membranen mit Tris-Maleat Puffer pH 5,2 (10 mM; 10 mM EDTA; 0,5 M NaCl; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit). (F) Überstand nach Dialyse des Rohextraktes (E) gegen Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit). (G) Bei der Dialyse des Rohextraktes (E) ausgefallene Bindeproteine. Die Penicillin-Bindeansätze wurden mit jeweils 1 mg Protein wie auf Seite 25 beschrieben durchgeführt.

Chromatographie über CM-Sepharose. Der dialysierte Rohextrakt (350 ml) wurde auf eine mit Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) äquilibrierte CM-Sepharose-Säule (2,6 x 21,5 cm; 110 ml; Fließgeschwindigkeit 23 ml/Std., Fraktionen: 15 Min) aufgepumpt und anschließend nicht bindendes Material mit 160 ml Äquilibrierpuffer ausgewaschen. Durch Waschen mit 180 ml des gleichen Puffers mit nur 2 % Triton X-100 wurde die Tritonkonzentration auf 0,2 % gesenkt. Die Säule wurde dann mit folgendem mehrstufigen Gradienten eluiert:

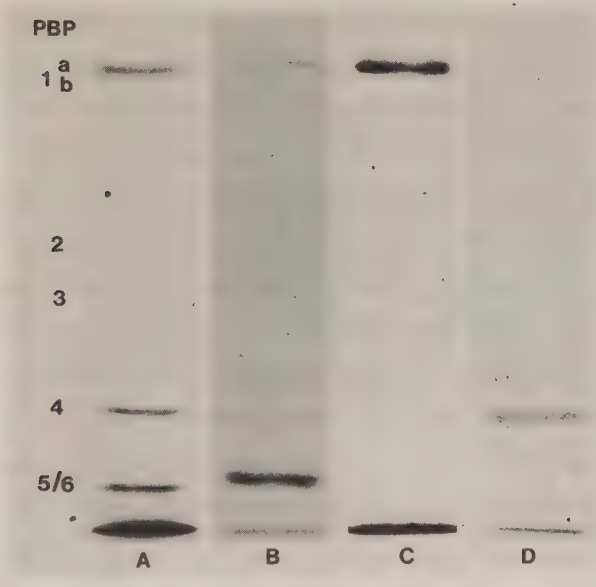
1) Salzstufe: 180 ml 10 mM Tris-Maleat; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit; 60 mM KCl.
2) pH-Sprung: 280 ml des gleichen Puffers mit pH 6,8; 60 mM KCl.
3) Salzgradient: 200 ml Puffer pH 6,8; 60 mM KCl.
und 200 ml Puffer pH 6,8; 300 mM KCl.

Das Elutionsmuster dieser Säule ist mit dem in Abbildung 27 dargestellten identisch. Die Endopeptidase-haltigen Fraktionen (zwischen 100 und 170 mM KCl) wurden vereinigt (70 ml) und für eine weitere Reinigung über Hydroxylapatit gegen 2 x 2 l Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (30 Min bei 28 000 x g) und der Überstand über eine Hydroxylapatit-Säule weiter gereinigt.

Mit Proben der einzelnen Elutionsstufen wurden Penicillin-Bindeansätze wie auf der Seite 25 beschrieben durchgeführt (siehe Abbildung 16).

Die Abbildung 16 zeigt, daß die mehrstufige Elution der CM-Sepharose-Säule zu einer vollständigen Trennung und Anreicherung der Penicillin-Bindeproteine 1a und 4 führte. Das PBP 1a eluierte in der ersten Salzstufe (60 mM KCl), während das PBP 4 erst im Gradienten (bei 120 mM KCl) eluiert wurde. Die Penicillin-Bindeproteine 1b, 2 und 3 waren schon bei der Dialyse des Rohextraktes durch Präzipitieren verloren gegangen (Abb. 15). Die PBP 5/6 konnten im Durchlauf der CM-Sepharose-Säule nachgewiesen werden (Abb. 16).

Abbildung 16: Trennung der Penicillin-Bindeproteine über CM-Sepharose.

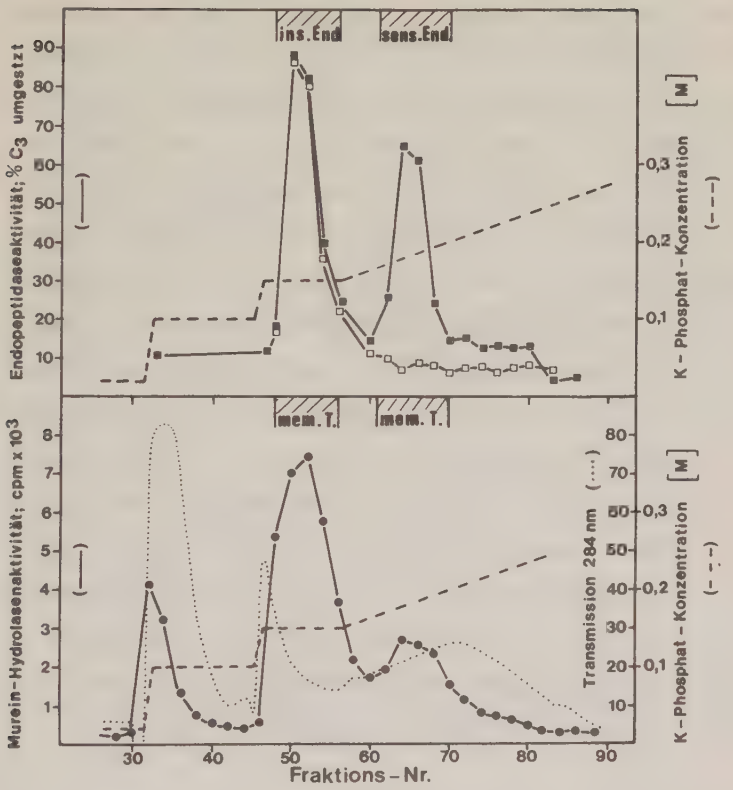


Mit Proben der verschiedenen Elutionsstufen der CM-Sepharose-Säule wurden Penicillin-Bindeansätze wie auf Seite 25 beschrieben durchgeführt. (A) Membranextrakt (500 µg Protein), dialysiert gegen Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit). (B) Durchlauf der CM-Sepharose-Säule (500 µg Protein). (C) Eluat der 1. Salzstufe (60 mM KCl; 200 µg Protein). (D) Eluat im Salzgradienten bei 120 mM KCl (200 µg Protein).

Chromatographie über Hydroxylapatit. Die von der CM-Sepharose-Säule eluierten DD-Endopeptidasen wurden auf einer mit dem Dialyse-Puffer äquilibrierten Hydroxylapatit-Säule weiter fraktioniert. Um eine gute Trennung bei der Chromatographie über Hydroxylapatit zu erreichen, sollten nicht mehr als 3 - 4 mg Protein pro ml Säulenvolumen aufgepumpt werden. Beim Auftragen von weniger als 3 mg Protein pro ml Säulenvolumen sinkt die Enzymausbeute unverhältnismäßig stark. Nach dem Aufpumpen des Enzyms (68 ml; 30 mg Protein) wurde mit Äquilibrierpuffer nachgewaschen und mit einem mehrstufigen Gradienten eluiert (Abbildung 17). Zur Stabilisierung der sehr schnell an Aktivität verlierenden Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase wurde in jede Frakion 20 µl einer Rinderserum-Albumin-Lösung (10 mg/ml) vorgelegt. Bei der ersten Elutionsstufe wurde die Konzentration des Kaliumphosphat-Puffers auf 100 mM erhöht. Dabei wurde sehr viel Protein und nur geringe Transglykosylaseaktivität eluiert, die als lösliche Transglykosylase (Molekulargewicht 65 000) identifiziert werden konnte (20). In einer zweiten Stufe wurde die Kaliumphosphat-Konzentration auf 150 mM erhöht. Mit dieser Stufe eluierte die Haupt-Transglykosylaseaktivität zusammen mit der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase. Die Transglykosylaseaktivität stammt hauptsächlich von der membrangebundenen Transglykosylase (Molekulargewicht 35 000; siehe Teil 4) (42). Im Verlauf des linearen Kaliumphosphat-Gradienten eluierte bei 175 mM die Penicillin-sensitive DD-Endopeptidase zusammen mit geringer Transglykosylaseaktivität, die, wie sich bei der weiteren Reinigung herausstellte, ebenfalls von der membrangebundenen Transglykosylase stammt (siehe Abbildung 18).

Die Fraktionen des Enzymgipfels der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase wurden vereinigt (23 ml; 4,8 mg Protein) und gegen 2 x 1 l Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert, um dann durch Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose weiter gereinigt zu werden. Parallel dazu wurde mit einem Teil dieser Probe (250 µl) der isoelektrische Punkt für die Penicillin-sensitive DD-Endopeptidase bestimmt.

Abbildung 17: Chromatographie über Hydroxylapatit.



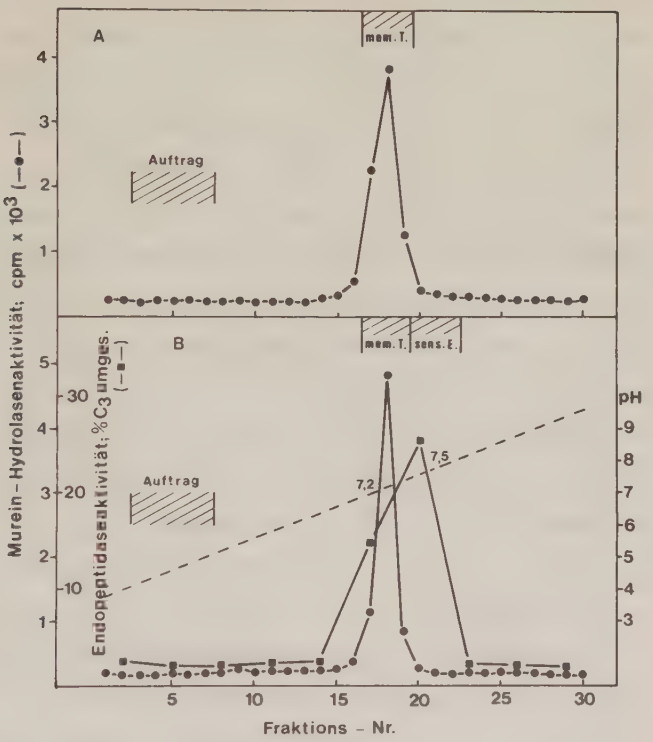
Die von der CM-Sepharose-Säule eluierten Endopeptidase-haltigen Fraktionen (68 ml; 30 mg Protein) wurden nach Dialyse gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule (1,4 x 7 cm; 10 ml; 3 ml/Std.; Fraktionen: 30 Min) aufgepumpt. Die Säule wurde mit 27 ml Äquilibrierpuffer gewaschen und mit folgendem mehrstufigen Gradienten eluiert.

1) 33 ml Kaliumphosphat-Puffer 100 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit.
2) 24 ml des gleichen Puffers 150 mM.
3) Gradient aus 70 ml des gleichen Puffers 150 mM und 95 ml 400 mM.

Die Enzymaktivitäten wurden wie auf den Seiten 17 und 18 beschrieben gemessen.

Isoelektrische Fokussierung. Versuche, den isoelektrischen Punkt der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase mit hochgereinigten Enzympräparaten zu bestimmen, scheiterten an der Instabilität des gereinigten Enzyms. Deshalb wurde mit der von der Hydroxylapatit-Säule eluierten DD-Endopeptidase, die noch geringe Mengen an membrangebundener Transglykosylase enthielt (siehe Abb. 17), der isoelektrische Punkt in einem granulierten Flachbett-Gel bestimmt. In der Nähe der Anode wurden 250 µl der über CM-Sepharose und Hydroxylapatit vorgereinigten Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase aufgetragen. Zum Vergleich wurde parallel eine Probe (250 µl) mit gereinigter membrangebundener Transglykosylase aufgetragen (siehe Ergebnis-Teil 4). Nach der Auftrennung der Proteine im pH-Gradienten erfolgte die Fraktionierung und die Elution der Fraktionen wie auf Seite 23 beschrieben. Die Abbildung 18 zeigt einen sehr scharfen Gipfel der membrangebundenen Transglykosylase bei pH 7,2 (vergleiche mit Abbildung 24) und einen breiten Gipfel mit Endopeptidase-Aktivität bei pH 7,5. Mit der isoelektrischen Fokussierung von entsprechenden Proben aus anderen Enzymaufarbeitungen wurden gut reproduzierbar die gleichen Ergebnisse erzielt. Die zum Vergleich parallel aufgetragene gereinigte membrangebundene Transglykosylase fokussierte ebenfalls bei pH 7,2 in einem sehr scharfen Gipfel.

Abbildung 18: Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase.

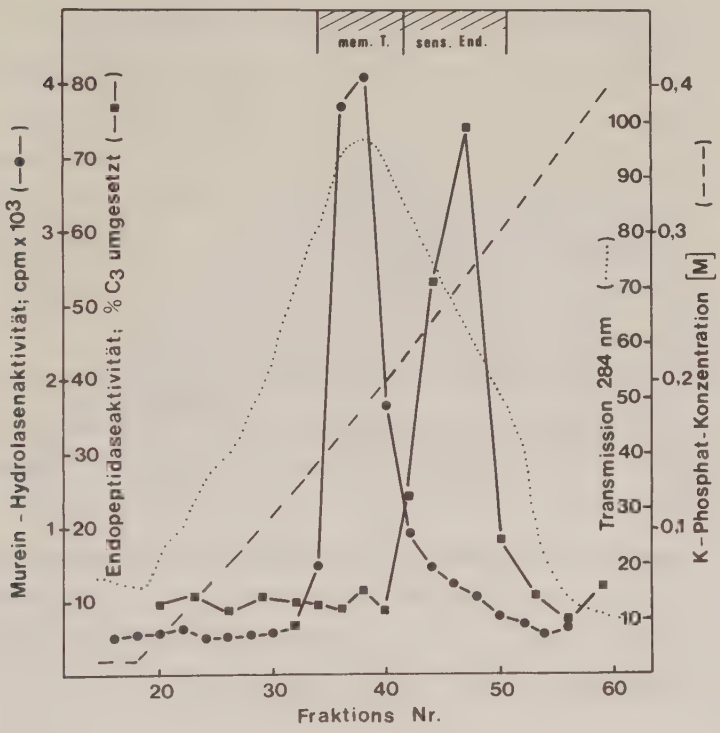


Auf ein granuliertes Flachbett-Gel (Ultrodex-Gel, LKB, vorbereitet nach Application Note 198) wurden 250 µl (56 µg Protein) der von der Hydroxylapatit-Säule eluierten Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase nach Dialyse gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) aufgetragen (B). Zum Vergleich wurden parallel 250 µl (140 µg Protein) gereinigter membrangebundene Transglykosylase aufgetragen (A). Das Gel enthielt Servalyte pH 2-11 (Endkonzentration 5 %), 0,2 % Triton X-100 und 0,1 mM Dithioerythrit. Es wurde 12 Stunden bei 200 Volt und 5 Stunden bei 400 Volt fokussiert. Die Transglykosylaseaktivität wurde in allen Fraktionen wie auf Seite 17 beschrieben bestimmt. In jeweils 3 Fraktionen gemeinsam (je 5 µl Enzymlösung) wurde die Penicillin-sensitive DD-Endopeptidaseaktivität wie auf Seite 18 beschrieben gemessen.

Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose. Die Penicillin-sensitive DD-Endopeptidase bindet wie die im Ergebnis-Teil 1 beschriebene Penicillin-insensitive DD-Endopeptidase an Polyuridylsäure und kann daher ebenfalls durch Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose gereinigt werden. Die von der Hydroxylapatit-Säule eluierte und gegen Kaliumphosphat-Puffer dialysierte Penicillin-sensitive DD-Endopeptidase (22,5 ml; 4,8 mg Protein) wurde auf eine mit dem Dialysepuffer äquilibrierte Poly U-Sepharose-Säule aufgepumpt (Abb. 19). Nicht gebundenes Protein wurde mit Äquilibrierpuffer ausgewaschen und die Säule dann mit einem Kaliumphosphat-Gradienten eluiert. Zur Stabilisierung der Enzymaktivität wurden in die Fraktionen jeweils 20 µl einer Rinderserum-Albumin-Lösung (10 mg/ml) vorgelegt. Die Abbildung 19 zeigt, daß die Transglykosylaseaktivität von der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase abgetrennt werden konnte. Die Transglykosylase wurde mit Hilfe ihres isoelektrischen Punktes (6,9 - 7,2) als die membrangebundene Transglykosylase identifiziert (siehe Ergebnis-Teil 4). Der Zusatz von Rinderserum-Albumin scheint die Trennfähigkeit der Poly U-Sepharose-Säule nicht zu beeinflussen.

Das im ersten Reinigungsschritt von der CM-Sepharose-Säule in der Salzstufe (60 mM KCl) eluierte Penicillin-Bindeprotein 1a (Abbildung 16) konnte ebenfalls über Poly U-Sepharose weiter angereichert werden. Auf eine zur Abbildung 19 identischen Poly U-Sepharose-Säule wurden 15 ml des vorgereinigten Penicillin-Bindeproteins 1a mit 7,2 mg Protein aufgepumpt. Das Waschen und Eluieren der Säule wurde wie in der Legende zu Abbildung 19 beschrieben durchgeführt. Zum Nachweis des Penicillin-Bindeproteins 1a im Säuleneluat wurden 200 µl jeder zweiten Fraktion gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert und wie auf Seite 25 beschrieben mit ^{14}C-Penicillin G radiomarkiert. Das Penicillin-Bindeprotein 1a eluierte im Kaliumphosphat-Gradienten zwischen 200 und 300 mM. Mit diesem angereicherten Penicillin-Bindeprotein 1a wurden die auf den Seiten 17-19 beschriebenen Mureinhydrolasentests durchgeführt. Es konnte in keinem Test Enzymaktivität gemessen werden.

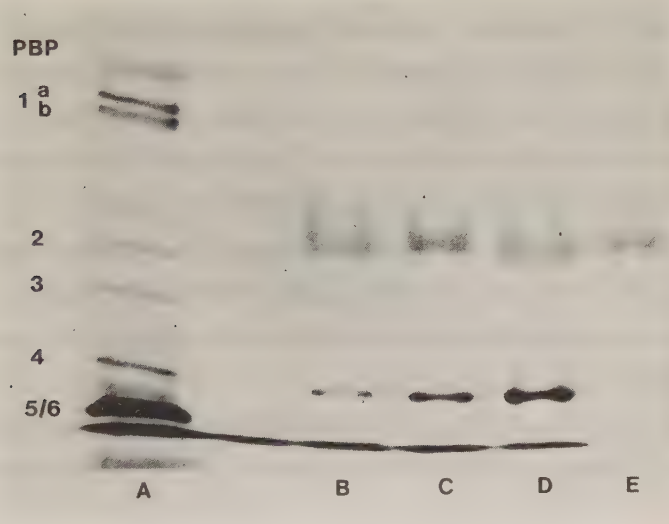
Abbildung 19: Affinitätschromatographie der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase über Poly U-Sepharose.



Die über CM-Sepharose und Hydroxylapatit vorgereinigte Penicillin-sensitive DD-Endopeptidase (22,5 ml; 4,8 mg Protein) wurde nach Dialyse gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Poly U-Sepharose-Säule aufgetragen (0,64 x 8 cm; 2,5 ml; Fließgeschwindigkeit 2,2 ml/Stunde; Fraktionen: 30 Min). Die Säule wurde mit 7 ml Äquilibrierpuffer gewaschen und mit einem Gradienten aus 37 ml Äquilibrierpuffer und 50 ml Kaliumphosphat-Puffer (500 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) eluiert. Die Enzymaktivitäten wurden wie auf den Seiten 17 und 18 beschrieben gemessen.

Identifizierung der DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB als Penicillin-Bindeprotein 4. Mit Proben aller Aufarbeitungsstufen wurden nach Dialyse gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) Versuche zur Radiomarkierung der Proteine mit ^{14}C-Penicillin G durchgeführt. Die Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und mit Hilfe der Fluorographie sichtbar gemacht (Seiten 23-25). Die Abbildung 20 zeigt, daß parallel zur Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase das Penicillin-Bindeprotein 4 angereichert wurde. Schon beim ersten Reinigungsschritt der CM-Sepharose-Säule konnten durch die mehrstufige Elution der Säule die anderen im Rohextrakt vorhandenen Penicillin-Bindeproteine abgetrennt werden (Abb. 16). Angaben über die spezifische Endopeptidaseaktivität können nach Zugabe von Rinderserum-Albumin zur Stabilisierung des Enzyms nicht gemacht werden. Die Abbildung 20 zeigt, daß außer dem Penicillin-Bindeprotein 4 auch das Rinderserum-Albumin durch ^{14}C-Penicillin G schwach radiomarkiert wurde. Die Penicilline sind auf Grund ihres ß-Lactam-Rings sehr reaktiv und können an verschiedene Proteine binden. Durch Öffnen des ß-Lactam-Rings wird eine Carboxylgruppe frei, die z.B. mit einer endständigen α-Aminogruppe oder einer ε-Aminogruppe eines Lysin-Restes des Insulins vom Schwein oder des Hühnereiweiß-Lysozyms reagieren kann (108).

Abbildung 20: Anreicherung des Penicillin-Bindeproteins 4 in den einzelnen Aufarbeitungsstufen.



In Proben der einzelnen Aufarbeitungsstufen wurden die Proteine wie auf Seite 25 beschrieben mit ^{14}C-Penicillin G radiomarkiert, mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die radiomarkierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht (Seiten 23-25). (A) Penicillin-Bindeproteine aus E.coli-Membranen nach Spratt (73) zur Markierung der Positionen der einzelnen Bindeproteine. (B) Endopeptidase-Gipfel der CM-Sepharose-Säule (300 µg Protein). (C) Endopeptidase-Gipfel der Hydroxylapatit-Säule (73 µg Protein). (D) Endopeptidase-Gipfel der Poly U-Sepharose-Säule (85 µg Protein). (E) Rinderserum-Albumin (10 µg Protein).

Diskussion . Wie bereits in der Einleitung zu diesem Abschnitt beschrieben, konnte bisher für die Identität der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase /Carboxypeptidase IB mit dem Penicillin-Bindeprotein 4 kein direkter Beweis erbracht werden. Die schon in meiner Diplomarbeit (53) ausgearbeitete Methode zur Reinigung dieser DD-Endopeptidase aus E.coli W7 konnte auf den Stamm PA 3092 übertragen und in einigen wichtigen Punkten verbessert werden. Dazu gehört die Extraktion der Membranen bei pH 5,2, die Reinigung in Gegenwart von 0,2 % Triton X-100, die mehrstufige Elution der CM-Sepharose-Säule, die Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose und die Stabilisierung des Enzyms durch Rinderserum-Albumin. Die Zugabe von Protein hat den Nachteil, daß keine genauen Angaben über die erzielten Anreicherungsfaktoren gemacht werden können.

Im Vergleich zu dem von Tamura et al. beschriebenen Reinigungsgang (47) wurde eine sehr viel einfachere und schnellere Methode zur Reinigung dieses Enzyms ausgearbeitet. Darüber hinaus konnte das von uns gereinigte Enzym in allen Aufarbeitungsstufen mit ^{14}C-Penicillin G radiomarkiert werden und als Penicillin-Bindeprotein 4 identifiziert werden. Das von Tamura et al. für das gereinigte Enzym angegebene Molekulargewicht von 41 000 weicht erheblich vom Molekulargewicht des Penicillin-Bindeproteins 4 ab (49 000) und wurde später auf 49 000 korrigiert (55).

Für eine mögliche physiologische Funktion dieser DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB gibt es bis jetzt nur wenige Hinweise. Mutanten, denen dieses Enzym bis auf eine Restaktivität (10 %) fehlt, wuchsen unter Laborbedingungen normal (54). Ebenso zeigten Mutanten mit fehlendem PBP 4 keine phänotypische Veränderung (49). In E.coli werden die Peptidseitenketten im neu synthetisierten Murein in zwei voneinander unabhängigen Stufen quervernetzt (109). Bei Mutanten, denen das PBP 4 fehlt, fehlt gleichzeitig die zweite Transpeptidierungsreaktion. Die bei E.coli beobachtete Umverteilung neu eingebauter Mureinvorstufen könnte mit dieser zweiten Transpeptidierung in

Zusammenhang stehen (28, 29).

Messungen der in vitro Mureinsynthese in verschiedenen PBP-Mutanten von Suzuki et al. brachten Hinweise auf die Beteiligung des Penicillin-Bindeproteins 1b bei einem der letzten Schritte der Mureinsynthese (49, 110). Aus der Beobachtung, daß Mutanten im Penicillin-Bindeprotein 1a oder 1b lebensfähig, Doppelmutanten aber letal sind, wurde geschlossen, daß sich diese beiden Proteine in ihrer Funktion ersetzen können. Mit dem angereicherten Penicillin-Bindeprotein 1a ist es möglich, in dem von Suzuki und Hirota ausgearbeiteten in vitro Mureinsynthese-System die physiologische Rolle dieses Bindeproteins in der Mureinbiosynthese zu untersuchen. Die Versuche zur Etablierung des in vitro Systems wurden mit Membranpräparationen aus verschiedenen PBP-Mutanten, aus dem Wildstamm (E.coli PA 3092) und mit partiell gereinigten Penicillin-Bindeproteinen durchgeführt (110). Nach diesen Rekonstitutionsexperimenten scheinen für eine erfolgreiche Mureinsynthese folgende Komponenten erforderlich:

Lipid-gebundenes N-Acetylmuraminsäure-pentapeptid und Membranpräparationen aus dem Wildstamm oder der PBP $1b^{-}$- Mutante mit Zusatz von angereichertem Penicillin-Bindeprotein 1b. Die Optimierung und Standardisierung des in vitro Mureinsynthese-Systems und die qualitative Analyse des synthetisierten Mureins könnte zur Aufklärung der physiologischen Rolle der Penicillin-Bindeproteine 1a und 1b beitragen.

Teil 4

Reinigung von Murein-Transglykosylasen aus Escherichia coli

Bei der Reinigung der beiden DD-Endopeptidasen wurden während der Aufarbeitung auch immer die Aktivitäten der anderen Mureinhydrolasen gemessen, um Informationen über die Möglichkeiten der Abtrennung dieser Enzyme von der zu reinigenden Endopeptidase zu erhalten. Bei sehr unterschiedlichen Methoden wie isoelektrischer Fokussierung, Chromatographie über Hydroxylapaptit, CM-Sepharose und Poly U-Sepharose fiel auf, daß es mindestens zwei Transglykosylase-Fraktionen gibt (siehe Abbildungen 17, 22, 24, 27). Eine lösliche Transglykosylase wurde bereits aus E.coli isoliert und charakterisiert (20, 37, 39). Dieses Enzym konnte später schnell und einfacher durch Affinitätschromatographie an Blue-Sepharose und Poly U-Sepharose gereinigt werden (40). Eine weitere, an die Membran gebundene Transglykosylase konnte nachgewiesen werden (42). Eine vergleichende Charakterisierung der beiden Transglykosylasen aber war bisher aus Mangel an genügend hochgereinigten Enzympräparaten nicht möglich. Zur präparativen Reinigung der membrangebundenen Transglykosylase sollte ein möglichst einfaches Verfahren gefunden werden. Für vergleichende Untersuchungen sollte die lösliche Transglykosylase ebenfalls präparativ gereinigt werden.

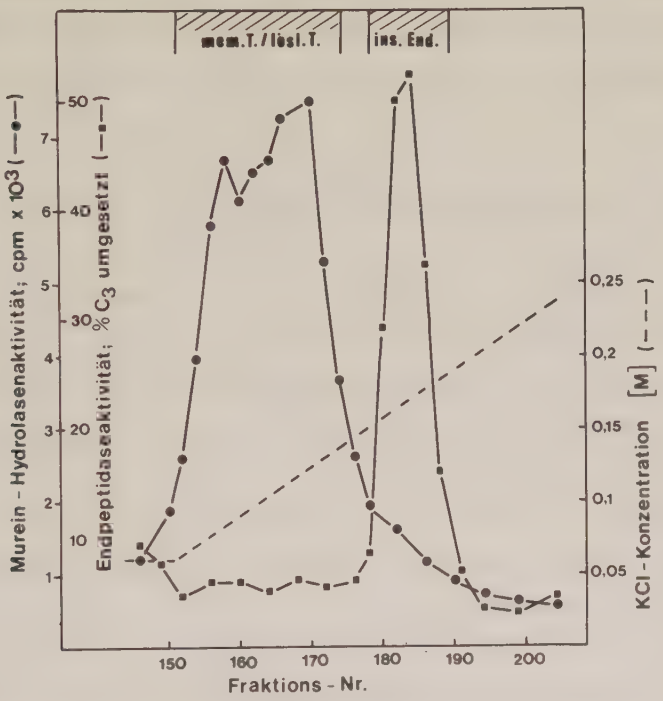
Zellaufschluß und Membranextraktion. Die beiden Transglykosylasen wurden ebenfalls aus E.coli PA 3092 isoliert. Die Anzuchtbedingungen für diese Bakterien sind auf Seite 14 beschrieben. 350 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden wie im Ergebnis-Teil 1 beschrieben mit Glasperlen geöffnet und durch Zentrifugation

in Überstand und Sediment getrennt. Der Oberstand wurde gegen 3 x 7 l Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert. Das dabei ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert (30 Min bei 28 000 x g) und der Überstand als Rohextrakt zur weiteren Reinigung der löslichen Transglykosylase verwendet. Die Reinigung dieser Transglykosylase diente nur Vergleichszwecken und wird in der Diskussion dieses Kapitels beschrieben.
Das Sediment (Zellhüllen) wurde in 400 ml Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2) resuspendiert und mit dem gleichen Volumen dieses Puffers mit 20 mM EDTA; 1 M NaCl; 4 % Triton X-100 aufgefüllt. Diese Suspension wurde zur Extrahierung der membrangebundenen Hydrolasen 2 Stunden im Kühlraum gerührt, die extrahierten Zellhüllen anschließend abzentrifugiert (60 Min bei 48 000 x g) und der Überstand gegen 3 x 7 l Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert und der Oberstand zur weiteren Reinigung der membrangebundenen Transglykosylase über CM-Sepharose verwendet.

Chromatographie des Rohextraktes über CM-Sepharose. Die zur ersten Anreicherung der membrangebundenen Transglykosylase verwendete CM-Sepharose-Säule wurde mit Dialysepuffer äquilibriert. Der Enzymrohextrakt nach Dialyse (700 ml; 1620 mg Protein) wurde auf die Säule gepumpt und nicht gebundenes Protein mit Äquilibrierpuffer ausgewaschen (540 ml). Die mehrstufige Elution der Säule wurde wie im Ergebnis-Teil 3 für die CM-Sepharose-Säule beschrieben durchgeführt. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Transglykosylase- und die beiden DD-Endopeptidaseaktivitäten getestet. Die Abbildung 21 zeigt den Gradientenausschnitt, in dem die Hydrolasen eluierten. Die Transglykosylase enthaltenden Fraktionen (149-168) wurden vereinigt, in einer Druckdialysezelle (PM 10 Membran, Amicon) auf 74 ml eingeengt und anschließend gegen 2 x 2 l Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit)

dialysiert. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (30 Min bei 28 000 x g). Die im Rohextrakt vorhandene Penicillin-sensitive DD-Endopeptidase konnte bei einigen Aufarbeitungen, auch bei der hier beschriebenen, in den Fraktionen der CM-Sepharose-Säule nicht nachgewiesen werden (Abbildung 21). Dies läßt sich wahrscheinlich durch einen in diesen Fällen raschen Aktivitätsverlust des sehr labilen Enzyms erklären. Nach Stabilisierung der Endopeptidase durch Zusatz von Rinderserum-Albumin eluierte dieses Enzym, bei guter Trennung über CM-Sepharose, als scharfer Gipfel bei 120 mM KCl (Abb. 27). Die für die Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase (Ergebnis-Teil 3) benutzte mehrstufige Elution der CM-Sepharose-Säule erwies sich auch für eine erste Anreicherung der membrangebundenen Transglykosylase als nützlich.

Abbildung 21: Chromatographie des Rohextraktes über CM-Sepharose.



Der Rohextrakt wurde nach Dialyse (700 ml; 1620 mg Protein) auf eine CM-Sepharose-Säule (5 x 17 cm; 320 ml; Fließgeschwindigkeit 56 ml/Std.; Fraktionen: 20 Min) aufgetragen und anschließend mit 540 ml Äquilibrierpuffer nachgewaschen. Nach Auswaschen des Triton X-100 auf 0,2 % wurde die Säule mit folgenden Puffern eluiert: (1) Salzstufe: 320 ml 10 mM Tris-Maleat; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit; 60 mM KCl. (2) pH-Sprung: 500 ml des gleichen Puffers mit pH 6,8 und 60 mM KCl. (3) linearer Salzgradient: 500 ml des Puffers mit pH 6,8 und 60 mM KCl und 500 ml des gleichen Puffers mit 300 mM KCl. Die Transglykosylase- und die Endopeptidaseaktivität wurde wie auf Seite 17 und 18 beschrieben gemessen.

Chromatographie über Hydroxylapatit. Die Chromatographie über CM-Sepharose führte nicht immer zu einer Trennung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase vom Hauptgipfel der Transglykosylase. In diesen Fällen wurde eine Auftrennung dieser beiden Aktivitäten durch Chromatographie über eine Hydroxylapatit-Säule erreicht (Abb. 17). Für die Reinigung der Transglykosylase, besonders im präparativen Maßstab, ist die Vorreinigung über eine Hydroxylapatit-Säule Voraussetzung für eine gute Trennung auf der folgenden Poly U-Sepharose-Säule.

Das dialysierte Transglykosylase-Konzentrat wurde auf eine mit dem Dialysepuffer äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule aufgepumpt. Das Volumen der Säule wurde so gewählt, daß nicht mehr als 3 - 4 mg Protein pro ml Säulenvolumen aufgetragen wurden. Die Elution der Säule wurde mit einer Kombination aus Stufen und linearem Kaliumphosphat-Gradienten, wie sie im Ergebnis-Teil 3 für die Abbildung 17 beschrieben ist, durchgeführt. Die Hauptaktivität an Transglykosylase eluierte bei 150 mM Kaliumphosphat. Nach guter Vorreinigung, vor allem bei vorheriger Abtrennung der Penicillin-insensitiven DD-Endopeptidase auf der CM-Sepharose-Säule (Abb. 21, 27), ist der von der Hydroxylapatit-Säule eluierte Transglykosylase-Gipfel (150 mM) frei von beiden Endopeptidaseaktivitäten. Die vereinigten Fraktionen (119 ml) wurden für die weitere Reinigung über Poly U-Sepharose gegen 2 x 2 l Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert.

Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose. Bei der Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase (Ergebnis-Teil 3) während der Chromatographie über Poly U-Sepharose eluierte der Transglykosylase-Gipfel bei sehr viel geringerer Kaliumphosphat-Konzentration als dies für die lösliche Transglykosylase bereits beschrieben war (40, 59, siehe Abb. 5 und 19).

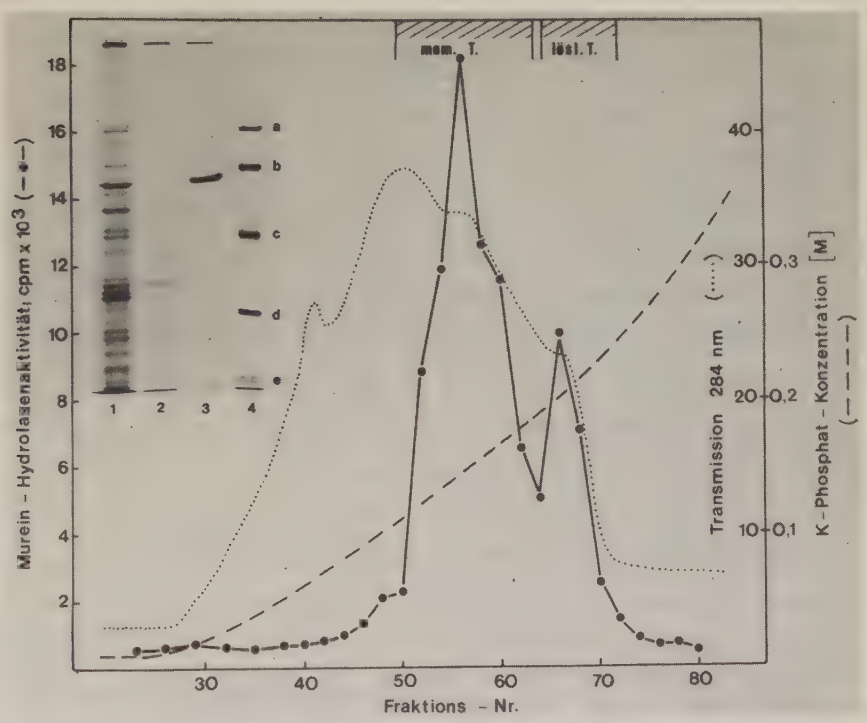
H. Mett hatte gezeigt, daß es eine zweite Transglykosylase gibt, die aus Membranen isoliert werden kann (42). Es lag die Vermutung nahe, daß es sich bei dem bei niedriger Salzkonzentration eluierenden Enzym um die membrangebundene Transglykosylase handelt und daß diese über Poly U-Sepharose gereinigt werden kann.

Die über CM-Sepharose und Hydroxylapatit vorgereinigte Transglykosylase-Fraktion (119 ml) wurde auf eine Poly U-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Proteins mit Äquilibrierpuffer wurde die Säule mit einem konkaven Kaliumphosphat-Gradienten (10 - 500 mM) eluiert (Abb. 22). Die Transglykosylaseaktivität konnte in einen Hauptgipfel (150 mM) und einen kleineren Gipfel (200 mM) getrennt werden (Abb. 22). Bei geringerer Beladung der Säule wurde eine vollständige Trennung der beiden Gipfel erreicht. Die Fraktionen der beiden Gipfel wurden jeweils vereinigt und gegen den Äquilibrierpuffer dieser Säule dialysiert (2 x 1 l). Für beide Enzymgipfel wurde durch papierchromatographische Analyse der Reaktionsprodukte aus Mureinsacculi Transglykosylaseaktivität nachgewiesen. Proben aus beiden Gipfeln und von dem aufgetragenen Enzym wurden wie auf Seite 24 beschrieben für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet und auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel (Seite 23) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel in Abbildung 22 zeigt, daß es sich bei den beiden Transglykosylasen um Proteine mit deutlich unterschiedlichem Molekulargewicht handelt. Die Transglykosylase im kleinen Gipfel ist mit der löslichen, von J. Höltje gefundenen Transglykosylase identisch (Molekulargewicht 65 000), während der Hauptgipfel im SDS-Polyacrylamidgel zwei dicht nebeneinander liegende Hauptbanden aufweist, deren Positionen den Molekulargewichten 34 000 und 35 000 entsprechen; dies stimmt mit dem von H. Mett vorgeschlagenen Molekulargewicht für die membrangebundene Transglykosylase überein. Da dieses Enzympräparat außer den beiden Hauptproteinen noch geringe Mengen an Fremdproteinen enthielt, wurde die als membrangebundene Transglykosylase identifizierte Hydrolase über eine Heparin-Sepharose-Säule weiter gereinigt.

Zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte der beiden Transglykosylasen wurden Proben der beiden Enzymgipfel im granulierten Flachbett-Gel fokussiert.

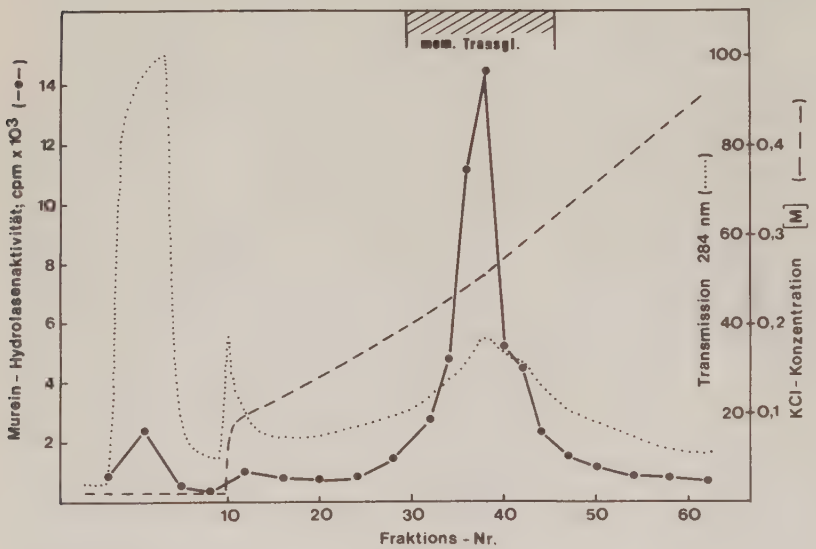
Affinitätschromatographie über Heparin-Sepharose. Viele DNS- und RNS-Polymerasen, Restriktions-Endonukleasen und andere Enzyme, die eine Bindungsstelle für Nukleinsäuren besitzen, konnten mit Hilfe von trägergebundenem Heparin gereinigt werden (97-99). Da auch die beiden Transglykosylasen Bindungsstellen für Nukleinsäuren haben, wurde die Hemmbarkeit der beiden Transglykosylasen durch Heparin gemessen. Die Aktivitäten beider Enzyme lassen sich schon durch 1 µg Heparin/ml zu 50 % hemmen (Abb. 26). Die von der Poly U-Sepharose-Säule eluierte Fraktion der membrangebundenen Transglykosylase wurde daher über eine Heparin-Sepharose-Säule weiter gereinigt. Die Fraktion der membrangebundenen Transglykosylase wurde gegen 2 x 1 l Kaliumphosphat-Puffer dialysiert und auf die Heparin-Sepharose CL-6B-Säule (Pharmacia) gepumpt, die Säule mit Äquilibrierpuffer gewaschen und anschließend mit einem Kaliumchlorid-Gradienten (100 - 600 mM) eluiert. Die Affinität der membrangebundenen Transglykosylase zur Heparin-Sepharose ist relativ hoch, so daß dieses Enzym erst bei 270 mM Kaliumchlorid eluierte (Abb. 23). Die in der Abbildung zu erkennende Schulter im Aktivitätsgipfel konnte bei flacheren Kaliumchlorid-Gradienten vom Hauptgipfel abgetrennt werden. Dabei wurde auch eine Trennung der beiden nach Chromatographie über Poly U-Sepharose erhaltenen Hauptproteinbanden erreicht. Der Hauptgipfel enthielt die Proteinbande mit dem Molekulargewicht 35 000 (Abb. 25), während in den Schulterfraktionen die zweite Proteinbande (34 000) gefunden wurde.

Abbildung 22: Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose.



Auf die mit Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) äquilibrierte Poly U-Sepharose 4 B-Säule (1 x 15 cm; 10 ml; 7 ml/Std.; Fraktionen: 20 Min) wurde die von Hydroxylapatit eluierte (150 mM Kaliumphosphat) Transglykosylase-Fraktion (119 ml; 66 mg Protein), nach Dialyse gegen den Äquilibrierpuffer, aufgepumpt. Nach Waschen der Säule mit Äquilibrierpuffer (30 ml) wurde mit einem konkaven Gradienten aus 100 ml Äquilibrierpuffer und 100 ml des gleichen Puffers mit 500 mM Kaliumphosphat eluiert. Die Transglykosylaseaktivität wurde wie auf Seite 17 beschrieben gemessen. Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel (10 %) wurden folgende Proben nach der auf Seite 24 beschriebenen Methode vorbereitet. (1) Aufgetragenes Enzym, 100 µl mit 56 µg Protein. (2) Gipfel der mem. Transgl., 20 µl mit 11 µg Protein. (3) Gipfel der lösl. Transgl., 100 µl mit 12 µg Protein. Als Eichproteine wurden 5 µl des Electrophoresis Calibration Kit (Pharmacia) aufgetragen. (a) Phosphorylase b (MG 94 000); (b) Rinderserum Albumin (MG 68 000); (c) Ovalbumin (MG 43 000); (d) Carboanhydrase (MG 30 000); (e) Trypsin Inhibitor (MG 20 100).

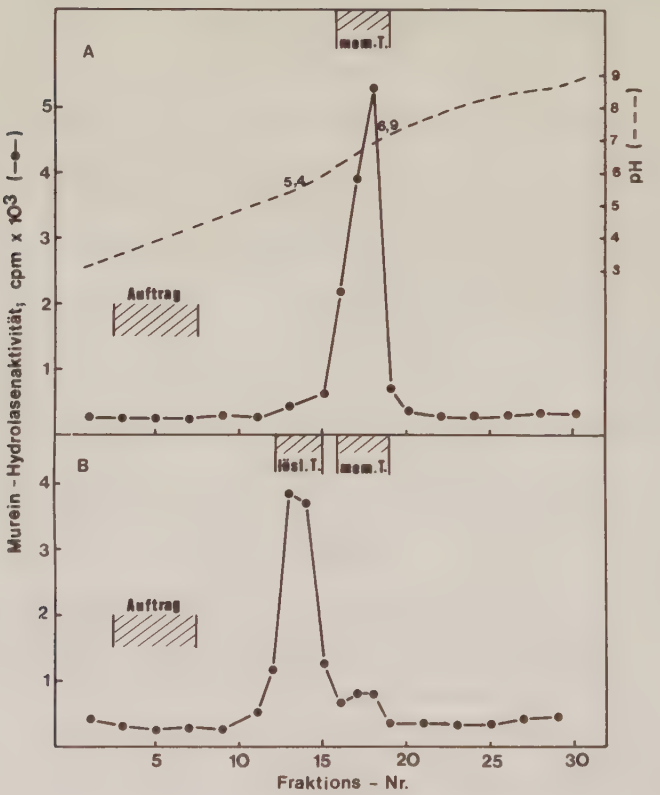
Abbildung 23: Affinitätschromatographie über Heparin-Sepharose.



Die über Poly U-Sepharose gereinigte Fraktion der membrangebundenen Transglycosylase (35 ml; 19,4 mg Protein) wurde gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) dialysiert und auf die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Heparin-Sepharose-Säule (1 x 7 cm; 5 ml; 8ml/Std.; Fraktionen 1 - 7: 60 Min, die folgenden Fraktionen: 30 Min) aufgetragen. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Proteins mit Äquilibrierpuffer wurde die Säule mit einem Gradienten aus je 100 ml Äquilibrierpuffer mit 100 mM oder 600 mM KCl eluiert. Die Transglykosylaseaktivität in den Fraktionen wurde wie auf Seite 17 beschrieben gemessen.

Isoelektrische Fokussierung. Zur besseren Charakterisierung der beiden durch Chromatographie an Poly U-Sepharose getrennten Transglykosylase-Gipfel wurde für beide Aktivitäten der isoelektrische Punkt bestimmt. Zur Vorbereitung des granulierten Flachbett-Gels wurden 4 g Ultrodex-Gel (LKB) in 100 ml Aq. bidest mit 0,2 % Triton X-100 und 5 % Servalyte (pH 2-11) gequollen. Nach Entlüftung der Gelsuspension wurde das Gel gegossen und bei 37°C auf den für das Gel angegebenen Trocknungsgrad (38 %) getrocknet. Das Gel wurde in der Apparatur (LKB 2117 Multiphor) auf 4°C vorgekühlt und die beiden Proben in der Nähe der Anode im sauren pH-Bereich aufgetragen. Die Laufbedingungen sind in der Legende zu Abbildung 24 beschrieben. Die Frakionierung des Gels und die Elution wurde wie auf Seite 23 beschrieben durchgeführt. Die Transglykosylaseaktivitäten wurden nach dem Standardverfahren gemessen (Seite 17). Die verwendeten Ampholine oder Servalyte ergaben in der in den Testansätzen vorliegenden Konzentration (0,5 %) keine Hemmung der Enzymaktivitäten. Die beiden durch Chromatographie über Poly U-Sepharose getrennten Transglykosylase-Gipfel zeigten auch in der isoelektrischen Fokussierung verschiedenes Verhalten. Die als lösliche Transglykosylase (MG 65 000) bezeichnete Aktivität lag bei einem isoelektrischen Punkt von 5,4, während die membrangebundene Transglykosylase (MG 35 000) bei pH 6,9 fokussierte (Abb. 24). Wie die Abbildung zeigt, enthielt die Fraktion der löslichen Transglykosylase noch Spuren der membrangebundenen Transglykosylase. Dieses Ergebnis wird von den in den Abbildungen 6 und 18 dargestellten isoelektrischen Fokussierungen bestätigt. Die Abweichung bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes für die membrangebundene Transglykosylase (6,9 - 7,2) kann durch eine zu kurze Laufzeit (2 Stunden) bei 600 Volt erklärt werden (Abb. 24). Bei weiteren Experimenten konnte der isoelektrische Punkt für die membrangebundene Transglykosylase bei 7,2 bestätigt werden.

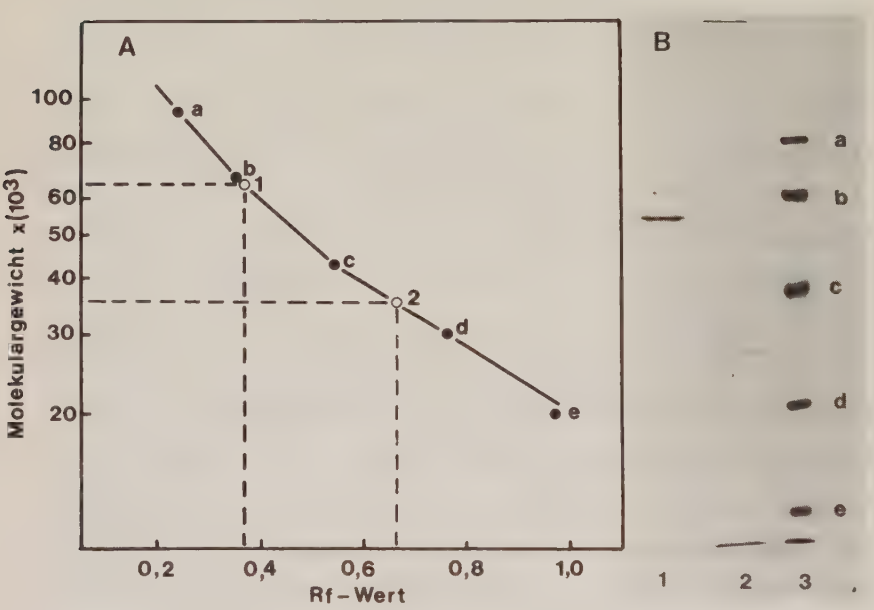
Abbildung 24: Die isoelektrischen Punkte der beiden Transglykosylasen.



Je 1 ml der beiden durch Chromatographie über Poly U-Sepharose-Säule erhaltenen Transglykosylase-Gipfel wurden nach Dialyse gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,2 % Triton X-100; 0,1 mM Dithioerythrit) auf ein granuliertes Flachbett-Gel (Ultrodex-Gel, LKB; Servalyte pH 2-11) aufgetragen. A: membrangebundene Transglykosylase (0,55 mg Protein). B: lösliche Transglykosylase (0,12 mg Protein). Die Auftrennung der Proteine im pH-Gradienten wurde bei konstanter Spannung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 200 Volt/15 Stunden, 400 Volt/3 Stunden und 600 Volt/2 Stunden. Das Gel wurde wie auf Seite 23 beschrieben fraktioniert und eluiert. Alle Fraktionen wurden auf Transglykosylaseaktivität getestet.

Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung. Zur Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung wurden Proben der gereinigten membrangebundenen und der löslichen Transglykosylase in SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (89). Für die lösliche Transglykosylase wurden 20 µl des von der Poly U-Sepharose-Säule eluierten Enzyms eingesetzt (Abb. 22, lösl. Trans.). Von der über die Heparin-Sepharose-Säule weiter gereinigten membrangebundenen Transglykosylase wurden 100 µl der Gipfelfraktionen eingesetzt (Abb. 23, mem. Trans.). Die Vorbereitung der Proben wurden wie auf Seite 24 beschrieben durchgeführt. Nach dem Auftragen wurden die Proben 45 Min bei einer konstanten Stromstärke von 12, 5 mA im Sammelgel konzentriert und dann 4 Stunden bei 18 mA aufgetrennt. Das Gel wurde gefärbt und entfärbt wie auf Seite 24 beschrieben. Die Abbildung 25B zeigt, daß mit dem hier beschriebenen Reinigungsverfahren sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Transglykosylase zur Homogenität gereinigt werden konnten. Für die lösliche Transglykosylase ergibt sich, wie aus Abbildung 25A ersichtlich, ein Molekulargewicht von 64 000, das recht gut mit dem von J. Höltje angegebenen Molekulargewicht von 65 000 übereinstimmt (20). Das Molekulargewicht der membrangebundenen Transglykosylase liegt bei 35 000 und entspricht dem von H. Mett für dieses Enzym vorgeschlagenen Molekulargewicht (42).

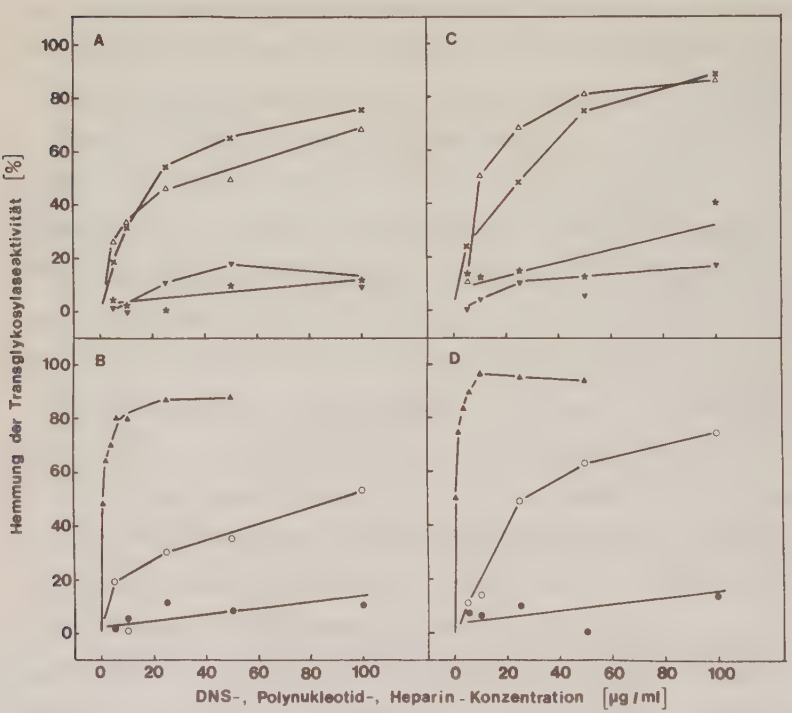
Abbildung 25: Elektrophorese der gereinigten Transglykosylasen in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel.



Für den Vergleich der Molekulargewichte der beiden Transglykosylasen wurden Proben der gereinigten Transglykosylasen und Eichproteine (je 2 µg Protein) aufgetragen. (1) Lösliche Transglykosylase (2 µg Protein, Molekulargewicht 65 000); (2) membrangebundene Transglykosylase (5 µg Protein, Molekulargewicht 35 000); (3) Eichproteine (Electrophoresis Calibration Kit, Pharmacia). a) Phosphorylase b, Molekulargewicht 94 000, b) Rinderserum-Albumin 68 000, c) Ovalbumin 43 000, d) Carboanhydrase 30 000, e) Trypsin Inhibitor 20 100.

Hemmung der Transglykosylasen durch DNS, Polynukleotide und Heparin. Die Hemmbarkeit der löslichen Transglykosylase durch Einzelstrang-DNS, Polynukleotide und Heparin wurde bereits beschrieben (40). Für einen Vergleich der Hemmbarkeit der löslichen und der membrangebundenen Transglykosylase wurde die Aktivität der beiden gereinigten Transglykosylasen in Gegenwart steigender DNS-, Polynukleotid- oder Heparin-Konzentration gemessen (Abb. 26). Einzelstrang-DNS wurde durch Erhitzen einer DNS-Lösung (5 Min, 100°C) mit anschließender schneller Abkühlung im Eisbad erhalten. Die DNS und die Polynukleotide wurden in 115 mM NaCl; 15 mM Na-citrat; pH 7,0, Heparin in Aqua bidest gelöst. Die Enzymtests wurden wie in der Legende zu Abbildung 26 beschrieben durchgeführt. Die Abbildung 26 zeigt, daß beide Transglykosylasen, wie schon für die insensitive Endopeptidase beschrieben (Abb. 9), durch Einzelstang-DNS oder Polynukleotide gehemmt werden, Doppelstrang-DNS oder Polynukleotide jedoch keine oder nur sehr geringe Hemmung der beiden Transglykosylaseaktivitäten bewirken. Wie im Ergebnis-Teil 1 beschrieben, bildet Polyadenylsäure bei saurem pH Doppelstränge aus (96) und hemmt folglich die Aktivitäten dieser beiden Enzyme nur gering. Heparin hemmt schon bei einer Konzentration von 1 µg/ml beide Enzyme zu 50 %. Bei einem Vergleich der Hemmbarkeit der beiden Transglykosylasen zeigt sich, daß die lösliche Transglykosylase stärker gehemmt wird (Abb. 26 C,D). Die größere Affinität der löslichen Transglykosylase zu Polyuridylsäure ermöglichte die Trennung der beiden Enzyme über eine Poly U-Sepharose-Säule (Abb. 22).

Abbildung 26: Hemmung der membrangebundenen und der löslichen Transglykosylase durch DNS, Polynukleotide und Heparin.



Die Aktivität der beiden gereinigten Transglykosylasen wurde in Gegenwart steigender Konzentration an DNS, Polynukleotiden oder Heparin gemessen. In 100 µl Gesamtvolumen (10 mM Tris-Maleat; pH 6,0; 10 mM $MgSO_4$; 0,2 % Triton X-100) wurden 10 µl ^{3}H-Dpm-markierte Sacculi (5 µg Murein; 3 x 10^3 cpm/µg) mit 10 µl der Enzymlösungen und jeweils 40 µl der verschiedenen Hemmstofflösungen für 60 Min bei 37°C inkubiert. (A,C) Polyuridylsäure (-Δ-); Polyguanylsäure (-x-); Polyadenylsäure (-▼-); Polyinosin-Cytidylsäure (-*-). (B,D) DNS aus Kalbsthymus, Doppelstrang (-●-) und Einzelstrang (-o-); Heparin (-▲-).

Diskussion . In E.coli gibt es eine ganze Reihe verschiedener Mureinhydrolasen (Tabelle 1). Öffnet man Zellen, findet man als auffallendste hydrolytische Aktivität die Transglykosylaseaktivität, die sowohl im Überstand als auch in der Membranfraktion (Zellhüllen) nachgewiesen werden kann. Aus der löslichen Fraktion mechanisch geöffneter Zellen wurde bereits eine lösliche Transglykosylase gereinigt und charakterisiert (20, 39, 40). Die an die Membran gebundene Transglykosylase wurde ebenfalls isoliert (42). Über die Verwandtschaft dieser beiden Transglykosylasen konnte bisher keine Aussage gemacht werden. Mit Hilfe von Antikörpern gegen eines der beiden Enzyme könnte auf eine Kreuzreaktion mit der zweiten Transglykosylase getestet werden. Weitere Hinweise auf ähnliche oder identische Aminosäuresequenzen der beiden Enzyme könnten durch einen Vergleich der Peptidmuster der beiden Transglykosylasen nach definierter Spaltung mit Bromycan oder nach Hydrolyse mit definiert spaltenden Proteasen erhalten werden. Um für diese Versuche genügend hochgereinigtes Protein zu erhalten, wurden präparative Reinigungsverfahren ausgearbeitet (siehe Ergebnisse).

Für die präparative Reinigung der membrangebundenen Transglykosylase wurde die Extrahierung und die erste Anreicherung des Enzyms wie bei der Reinigung der membrangebundenen Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase durchgeführt (Ergebnis-Teil 3). Bei guter Ausnutzung der Trennleistung dieser CM-Sepharose-Säule konnte eine Auftrennung der im Membranextrakt enthaltenen Mureinhydrolasen, wie sie in Abbildung 27 dargestellt ist, erreicht werden (vergleiche Abb. 21). Die beiden DD-Endopeptidasen wurden im linearen Salzgradienten klar voneinander getrennt. Die Transglykosylaseaktivität (hauptsächlich membrangebundene Transglykosylase) eluierte in 3 Gipfeln, von denen der bei 80 mM KCl eluierende Gipfel frei von DD-Endopeptidase war. Die beiden anderen Transglykosylase-Gipfel eluierten jedoch mit den beiden DD-Endopeptidase-Gipfeln.

Die Trennung der drei Mureinhydrolasen erleichterte sowohl die weitere Reinigung der Penicillin-sensitiven DD-Endopeptidase (Ergebnis-Teil 3) als auch

die in diesem Teil beschriebene Reinigung der membrangebundenen Transglykosylase. Eine klare Trennung der beiden Transglykosylasen (lösliche und membrangebundene) wurde durch Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose erreicht (Abb. 22). Fraktionen mit sehr angereicherter membrangebundener Transglykosylase (Poly U-Sepharose, Heparin-Sepharose, Isoelektrische Fokussierung) zeigten im SDS-Polyacrylamid-Gel zwei dicht übereinander liegende Hauptbanden mit Molekulargewichten von 34 000 und 35 000 (Abb. 22). Diese beiden Proteine konnten nur über Poly U-Sepharose oder Heparin-Sepharose durch Elution mit einem sehr flachen Gradienten getrennt werden. Das Protein mit dem Molekulargewicht 34 000 hatte nur sehr geringe Transglykosylaseaktivität. Das ähnliche Verhalten der beiden Proteine und die sehr geringe spezifische Aktivität des kleineren Proteins läßt vermuten, daß es sich um ein proteolytisches Spaltprodukt handeln könnte. Ein Vergleich der Peptidmuster der beiden Proteine würde zur Klärung dieser Frage beitragen.

Für die vergleichende Charakterisierung der löslichen und membrangebundenen Transglykosylase wurde das lösliche Enzym im wesentlichen nach dem im Ergebnis-Teil 1 für die Penicillin-insensitive DD-Endopeptidase beschriebenen Reinigungsverfahren isoliert. Nach Chromatographie des Rohextraktes über CM- und DEAE-Sepharose (siehe Seite 29-30) wurde die Transglykosylase-Fraktion über eine Hydroxylapatit-Säule weiter gereinigt (Abb. 28). Die Abbildung 28 zeigt zwei klar voneinander getrennte Gipfel an Mureinhydrolasenaktivität. Eine chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte beider Enzyme aus Murein zeigte, daß es sich in beiden Fällen um Transglykosylaseaktivität handelt. Beide Enzymgipfel wurden, wie in der Legende zu Abbildung 5 beschrieben, getrennt über Poly U-Sepharose weiter gereinigt. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes und des Molekulargewichtes zeigte, daß es sich bei dem zuerst von der Hydroxylapatit-Säule eluierten (100 mM Kaliumphosphat) Enzym um die lösliche Transglykosylase handelt (Molekulargewicht 65 000), isoelektrischer Punkt 5,4).

Abbildung 27: Erste Anreicherung der membrangebundenen Mureinhydrolasen über DM-Sepharose.

Der Rohextrakt aus 200 g Zellen wurde nach Dialyse gegen Tris-Maleat Puffer (10 mM; pH 5,2; 10 mM $MgSO_4$; 2 % TX-100; 0,1 mM Dithioerythrit) auf eine mit dem Dialysepuffer äquilibrierte CM-Sepharose-Säule (2,6 x 21 cm; 110 ml; Fließgeschwindigkeit 21 ml/Stunde; Fraktionen: 15 Min) aufgetragen. Die Säule wurde zuerst mit 150 ml Äquilibrierpuffer und dann mit 200 ml Puffer mit nur 0,2 % TX-100 gewaschen. Die Elution der Säule wurde wie auf Seite 56 beschrieben durchgeführt.

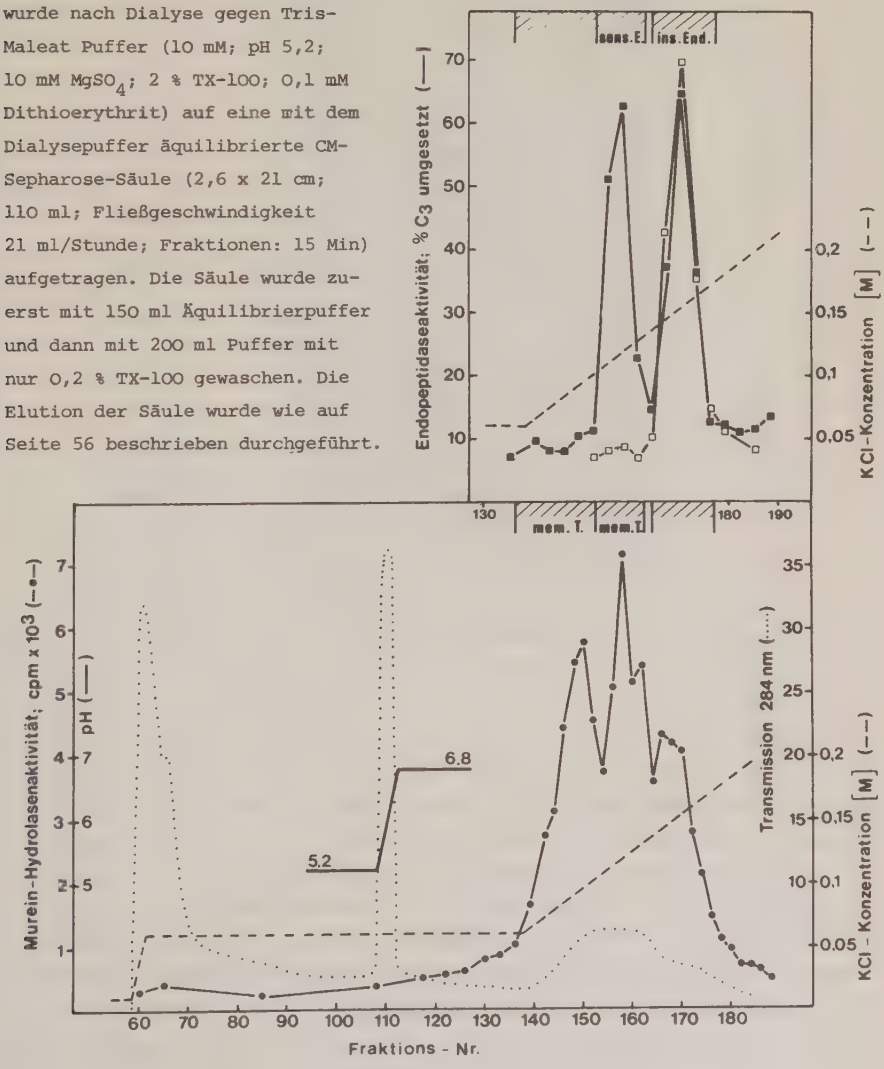
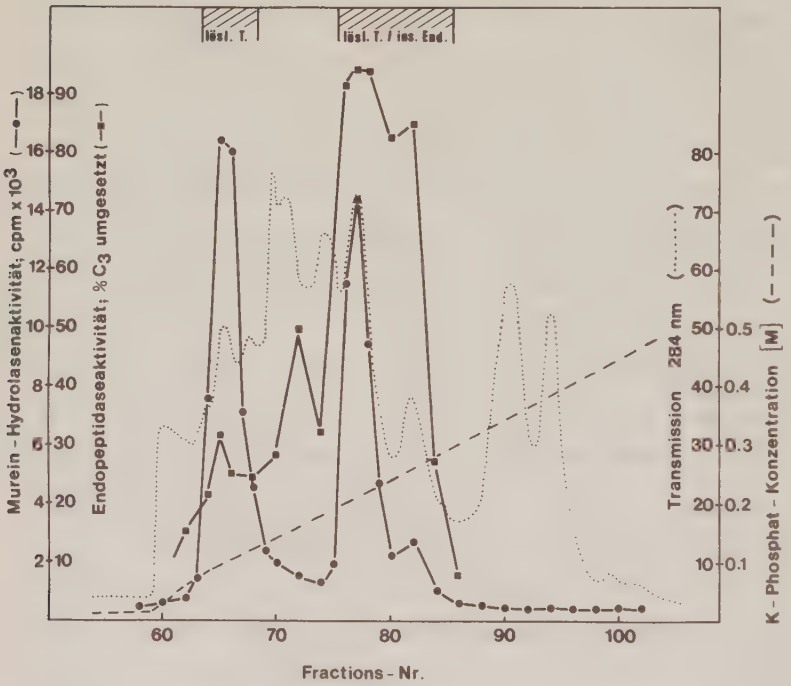
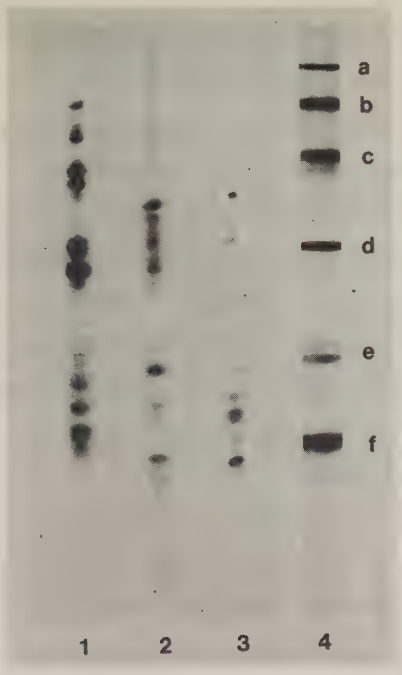


Abbildung 28: Chromatographie der löslichen Transglykosylase über Hydroxylapatit.



Die von der DEAE-Sepharose eluierte Fraktion der löslichen Transglykosylase (450 ml; 500 mg Protein) wurde nach Dialyse gegen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM; pH 7,0; 0,1 mM Dithioerythrit) auf eine mit dem Dialysepuffer äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule aufgepumpt (2,5 x 22,5 cm; 110 ml; Fließgeschwindigkeit 44 ml/Std.; Fraktionen: 20 Min). Die Säule wurde mit Äquilibrierpuffer gewaschen und anschließend mit einem linearen Kaliumphosphat-Gradienten eluiert (250 ml Äquilibrierpuffer und 250 ml 500 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 7,0; 0,1 mM Dithioerythrit). Die Enzymaktivitäten wurden wie auf Seite 17 und 18 beschrieben gemessen.

Abbildung 29: Peptidmuster der drei Transglykosylase-Fraktionen nach Spaltung mit Bromcyan.



Zum Vergleich der Peptidmuster der drei gereinigten Transglykosylase-Fraktionen wurde eine Bromcyan - Spaltung nach der von Nikodem et al. beschriebenen Methode durchgeführt (111). Proben der gereinigten Enzyme wurden wie auf den Seiten 23 und 24 beschrieben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese vorbereitet und in einem 10 %igen Gel aufgetrennt. Die gefärbten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und 3 Stunden bei Raumtemperatur in der Reaktionsmischung aus 20 µl CNBr in Acetonitril (250 µg/100 µl); 200 µl 0,125 M Tris/HCl; pH 6,8 und 200 µl 0,6N HCl inkubiert. Nach 3maligem Waschen der Proben in je 25 ml 0,125 M Tris/HCl; pH 6,8; 0,1 % SDS (2 Stunden) wurden die Gelstücke in Probenpuffer überführt und gleich in die Taschen eines 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels eingeschoben und die Peptide elektrophoretisch aufgetrennt. (1) Lösliche Transglykosylase (40 µg Protein). (2) Dritte Transglykosylase (30 µg Protein). (3) Membrangebundene Transglykosylase (50 µg Protein). (4) Eichproteine. a) Phosphorylase b (MG 94 000); b) Rinderserum-Albumin (MG 68 000); c) Ovalbumin (MG 43 000); d) Carboanhydrase (MG 30 000); e) Trypsin Inhibitor (MG 20 100); f) α-Lactalbumin (MG 14 400).

Das bei 200 mM Kaliumphosphat eluierte zweite Enzym scheint in beiden Eigenschaften mit der membrangebundenen Transglykosylase identisch zu sein (Molekulargewicht 35 000, isoelektrischer Punkt 7,0). Die membrangebundene Transglykosylase kann jedoch nur in Gegenwart von Triton X-100 in Lösung gehalten und gereinigt werden (42).

Mit den drei gereinigten Transglykosylse-Fraktionen wurde eine Analyse der Peptidmuster nach Bromcyan-Spaltung durchgeführt (111). Ein Vergleich der Peptidmuster in Abbildung 29 zeigt, daß es keine oder eine nur geringe Übereinstimmung in einzelnen Peptidbanden gibt. Nach diesen Ergebnissen scheint es in Escherichia coli drei voneinander verschiedene Murein-Transglykosylasen zu geben. Durch genaue Analyse der aus Murein freigesetzten Spaltprodukte dieses dritten Enzyms und eine N-terminale Aminosäureanalyse der drei Enzymproteine muß geklärt werden, ob es sich wirklich um drei gänzlich unterschiedliche Transglykosylasen handelt.

IV Zusammenfassung

Aus Escherichia coli PA 3092 wurde eine neue, lösliche DD-Endopeptidase isoliert, die im Gegensatz zu bisher bekannten Enzymen gleicher Spezifität durch ß-Lactam Antibiotika nicht gehemmt werden kann. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 30 000 und einen isoelektrischen Punkt von 6,8. Die Aktivität des Enzyms kann durch Einzelstrang-DNS, Polynukleotide und Heparin gehemmt werden. Diese Eigenschaft ermöglichte eine Reinigung des Enzyms durch Affinitätschromatographie über Poly U-Sepharose.

Die Endopeptidase ist in der Lage, die Peptidbrücken in intakten Mureinsacculi zu spalten und konnte daher für Untersuchungen zur Anordnung der Zuckerketten im Sacculus genutzt werden. Die Peptidbrücken in isolierten Mureinsacculi wurden mit gereinigter DD-Endopeptidase partiell gespalten. Nach dieser Auflockerung des Mureingerüsts wurde im Elektronenmikroskop eine vorzugsweise Orientierung der Zuckerketten quer zur Längsachse der Zelle sichtbar. Zur Kontrolle wurden Sacculi mit Transglykosylase aus E.coli oder Lysozym aus Hühnereiweiß inkubiert, dabei konnte keine orientierte Strukturierung der Sacculi beobachtet werden.

Die Penicillin-sensitive DD-Endopeptidase/Carboxypeptidase IB wurde aus Escherichia coli PA 3092 isoliert und in gereinigter Form direkt als Penicillin-Bindeprotein 4 charakterisiert. Auch dieses Enzym konnte affinitätschromatographisch über eine Poly U-Sepharose-Säule gereinigt werden. Der isoelektrische Punkt dieses Enzyms liegt bei 7,5. Das Penicillin-Bindeprotein 1a wurde über CM-Sepharose und Poly U-Sepharose stark angereichert. Für dieses Bindeprotein konnte keine enzymatische Aktivität in den Standard-Hydrolasentests gemessen werden.

Für die Reinigung der membrangebundenen Transglykosylase aus Escherichia coli konnte ein präparativer Reinigungsgang ausgearbeitet werden. Für vergleichende

Experimente der beiden Enzyme wurde auch die bereits beschriebene lösliche Transglykosylase gereinigt. Beide Transglykosylasen unterscheiden sich sowohl in ihrem Molekulargewicht, als auch in ihrem isoelektrischen Punkt erheblich. Die lösliche Transglykosylase hat ein Molekulargewicht von 65 000 und einen isoelektrischen Punkt von 5,4, während für die membrangebundene Transglykosylase ein Molekulargewicht von 35 000 und ein isoelektrischer Punkt von 7,2 bestimmt wurde. Bei der Reinigung der löslichen Transglykosylase wurde eine weitere Transglykosylase isoliert, die im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt identisch mit der membrangebundenen Transglykosylase ist. Unterschiedliche Peptidmuster der drei Enzyme nach Bromcyan-Spaltung geben Hinweis auf die Existenz von drei unterschiedlichen Murein-Transglykosylasen in Escherichia coli.

V LITERATURVERZEICHNIS

1. De Petris, S. (1967). Ultrastructure of the Cell Wall of Escherichia coli and Chemical Nature of Its Constituent Layers. J. Ultrastruct. Res. 19, 45-83.

2. Suit, J.C. (1962). Ribonucleic Acid in a "Membrane" Fraction of Escherichia coli and Its Relation to Cell-Wall Synthesis. J. Bacteriol. 84, 1061-1070.

3. Leive, L. (1974). The Barrier Function of the Gram-Negative Envelope. Annals of the New York Academy of Science 235, 109-127.

4. Braun, V. (1978). Structure-Function Relationships of the Gram-Negative Bacterial Cell Envelope. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 28, 111-138.

5. Braun, V., Bosch, V., Klumpp, E.R., Neff, I., Mayer, H., and Schlecht, S. (1976). Antigenic Determinants of Murein Lipoprotein and Its Exposure at the Surface of Enterobacteriaceae. Eur. J. Biochem. 62, 555-566.

6. Inouye, M., Shaw, J., and Shen, C. (1972). The Assembly of a Structural Lipoprotein in the Envelope of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 247, 8154-8159.

7. Braun, V. and Bosch V. (1972). Repetitive Sequences in the Murein-Lipoprotein of the Cell Wall of Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 970-974.

8. Weidel, W., Frank, H., and Martin, H.H. (1960). The Rigid Layer of the Cell Wall of Escherichia coli Strain B. J. gen. Microbiol. 22, 158-166.

9. Costerton, J.W., Ingram, J.M., and Cheng, K.-J. (1974). Structure and Function of the Cell Envelope of Gram-Negative Bacteria. Bacteriol. Rev. 38, 87-110.

10. Weidel, W. and Pelzer, H. (1964). Bagshaped Macromolecules - A New Outlook on Bacterical Cell Walls. Adv. in Enzymol. 26, 193-232.

11. Salton, M.R.J. and Horne, R.W. (1951). Studies of the Bacterial Cell Wall. Biochim. Biophys. Acta 7, 177-197.

12. Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications.
Bacteriol. Rev. 36, 407-477.

13. Schwarz, U., Asmus, A., and Frank, H. (1969). Autolytic Enzymes and Cell Divison of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 41, 419-429.

14. Braun, V., Gnirke, H., Henning, U., and Rehn, K. (1973). Model for the Structure fo the Shape-Maintaining Layer of the Escherichia coli Cell Envelope.
J. Bacteriol. 114, 1264-1270.

15. Jeanloz, R.W., Sharon, N., and Flowers, H.M. (1963). The Chemical Structure of a Disaccharide Isolated from Micrococcus lysodeikticus Cell Wall.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 20-25.

16. Schindler, M., Mirelman, D., and Schwarz, U. (1976). Quantitative Determination of N-Acetylglucosamine Residues at the Non-reducing Ends of Peptidoglycan Chains by Enzymatic Attachment of ^{14}C-D-Galactose.
Eur. J. Biochem. 71, 131-134.

17. Schwarz, U. and Leutgeb, W. (1971). Morphogenetic Aspects of Murein Structure and Biosynthesis.
J. Bacteriol. 106, 588-595.

18. Braun, V. and Rehn, K. (1969). Chemical Characterization, Spatial Distribution and Function of a Lipoprotein (Murein-Lipoprotein) of the E.coli Cell Walls.
Eur. J. Biochem. 10, 426-438.

19. Primosigh, J., Pelzer, H., Maass, D., and Weidel, W. (1961). Chemical Characterization of Mucopeptides Released from the E.coli B Cell Wall by Enzymic Action.
Biochim. Biophys. Acta 46, 68-80.

20. Höltje, J.-V., Mirelman, D., Sharon, N., and Schwarz, U. (1975). Novel Type of Murein Transglycosylase in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 124, 1067-1076.

21. Taylor, A., Das, B.C., and Van Heijenoort, J. (1975). Bacterial-Cell-Wall-Peptidoglycan Fragments Produced by Phage λ or Vi II Endolysin and Containing 1,6-Anhydro-N-actylmuramic Acid.
Eur. J. Biochem. 53, 47-54.

22. Henning, U., Rehn, K., Braun, V., Höhn, B., and Schwarz, U. (1972). Cell Envelope and Shape of Escherichia coli K12.
Eur. J. Biochem. 26, 570-586.

23. Leutgeb, W. and Schwarz, U. (1967). Abbau des Mureins als erster Schritt beim Wachstum des Sacculus.
Z. Naturforsch. 22 b. 545-549.

24. Goodell, E.W. and Schwarz, U. (1977). Enzymes Synthesizing and Hydrolyzing Murein in Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 81, 205-210.

25. Hoffmann, B., Messer, W., and Schwarz, U. (1972). Regulation of Polar Cap Formation in Life Cycle of Escherichia coli.
J. Supramolec. Struct. 1, 29-37.

26. Beck, B.D. and Park, J.T. (1976). Activity of Three Murein Hydrolases During the Cell Division Cycle of Escherichia coli K-12 as Measured in Toluene-Treated Cells.
J. Bacteriol. 126, 1250-1260.

27. Hartmann, R., Bock-Hennig, S.B., and Schwarz, U. (1974). Murein Hydrolases in the Envelope of Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 41, 203-208.

28. Ryter, A. and Hirota, Y. (1973). Process of Cellular Division in Escherichia coli Growth Pattern of E.coli Murein.
J. Mol. Biol. 78, 185-195.

29. Schwarz, U., Ryter, A., Rambach, A., Hellio, R., and Hirota, Y. (1975). Process of Cellular Division in Escherichia coli: Differentiation of Growth Zones in the Sacculus.
J. Mol. Biol. 98, 749-759.

30. Lin, E.C.C., Hirota, Y., and Jacob, F. (1971). On the Process of Cellular Division in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 108, 375-385.

31. Ghuysen, J.-M. (1977). The Synthesis, Assembly and Turnover of Cell Surface Components; ed. G. Poste and G.L. Nicholson.
(Elsevier/North-Holland Biomedical Press) 463-573.

32. Ghuysen, J.-M. and Shockman, G.D. (1973). Bacterial Membranes and Walls; ed. L. Leive.
(M. Dekker Inc. New York) 37-130.

33. Mirelman, D., Bracha, R., and Sharon, N. (1974). Penicillin-Induced Secretion of a Soluble, Uncross-Linked Peptidoglycan by Micrococcus luteus Cells.
Biochem. 13, 5045-5053.

34. Van Heijenoort, Y., Derrien M., and Van Heijenoort, J. (1978). Polymerization by Transglycosylation in the Biosynthesis of the Peptidoglycan of Escherichia coli K 12 and Its Inhibition by Antibiotics.
FEBS Lett. 89, 141-144.

35. Ghuysen, J.-M. (1977). Penicillin-sensitive Enzymes of Peptidoglycan Metabolism.
Microbiol. 195-202.

36. Izaki, K., Matsuhashi, M., and Strominger, J.L. (1968). Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls.
J. Biol. Chem. 243, 3180-3192.

37. Hartmann, R., Höltje, J.-V., and Schwarz, U. (1972). Targets of Penicillin Action in Escherichia coli.
Nature 235, 426-429.

38. Klencke, S. (1979). Genetische und physiologische Charakterisierung von Mutanten von E.coli PA 3092 mit einem Defekt der N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase.
Dissertation, Tübingen.

39. Höltje, J.-V. (1973). Reinigung und Charakterisierung einer Murein-Transglykosaminidase aus Escherichia coli.
Dissertation, Tübingen.

40. Kusser, W. and Schwarz, U. (1980). Escherichia coli Murein Transglykosylase; Purification by Affinity Chromatography and Interaction with Polynucleotides
Eur. J. Biochem. 103, 277-281.

41. Beachey, E.H., Keck, W., de Pedro, M.A., and Schwarz, U. (1980). Exoenzymatic Activity of Transglycosylases Isolated from Escherichia coli.
J. Bacteriol. in press.

42. Mett, H., Keck, W., Funk, A., and Schwarz, U. (1980). Two different species of Murein Transglycosylase in Escherichia coli.
J. Bacteriol. submitted for publication.

43. Pelzer, H. (1963). Mucopeptidhydrolasen in Escherichia coli B.
Z. Naturforsch. 18 b, 950-964.

44. Mett, H. (1977). Reinigung und Charakterisierung des zelleigenen Lysozyms aus Escherichia coli.
Dissertation, Tübingen.

45. Yem, D.W. and Wu, H.C. (1976). Purification and Properties of β-N-Acetylglucosaminidase from Escherichia coli.
J. Bacteriol. 125, 324-331.

46. Yem, D.W. and Wu, H.C. (1976). Isolation of Escherichia coli K-12 Mutants with Altered Levels of β-N-Acetylglucosaminidase.
J. Bacteriol. 125, 372-373.

47. Tamura, T., Imae, Y., and Strominger, J.L. (1976). Purification to Homogeneity and Properties of Two D-Alanine Carboxypeptidases I from Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 251, 414-423.

48. Spratt, B.G. and Strominger, J.L. (1976). Identification of the Major Penicillin-Binding Proteins of Escherichia coli as D-Alanine Carboxypeptidase IA.
J. Bacteriol. 127, 660-663.

49. Suzuki, H., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1978). On the Process of Cellular Divison in Escherichia coli: A Series of Mutants of E.coli Altered in the Penicillin-Binding Proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 664-668.

50. Matsuhashi, M., Maruyama, I.N., Takagaki, Y., Tamaki, S., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1978). Isolation of a Mutant of Escherichia coli Lacking Penicillin-Sensitive D-Alanine Carboxypeptidase IA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2631-2635.

51. Matsuhashi, M., Tamaki, S., Curtis, S.J., and Strominger, J.L. (1979). Mutational Evidence for Identity of Penicillin-Binding Protein 5 in Escherichia coli with the Major D-Alanine Cargoxypeptidase IA Activity.
J. Bacteriol. 137, 644-647.

52. Nishimura, Y., Suzuki, H., Hirota, Y., and Park, J.T. (1980). A Mutant of Escherichia coli Defective in Penicillin-Binding Protein 5 and Lacking D-Alanine Carboxypeptidase IA.
Submitted for publication.

53. Keck, W. (1977). Reinigung und Charakterisierung von Murein-Endopeptidasen aus Escherichia coli.
Diplomarbeit, Tübingen.

54. Matsuhashi, M., Takagaki, Y., Maruyama, I.N., Tamaki, S., Nishimura, Y., Suzuki, H., Ogino, U., and Hirota, Y. (1977). Mutants of Escherichia coli Lacking in Highly Penicillin-Sensitive D-Alanine Carboxypeptidase Activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2976-2979.

55. Iwaya, M. and Strominger, J.L. (1977). Simultaneous Deletion of D-Alanine Carboxypeptidase IB-C and Penicillin-Binding Component IV in a Mutant of Escherichia coli K 12.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2980-2984.

56. Schwarz, U. Keck, W., Klencke, S., and Mett, H. (1977). Murein Hydrolase System of E.coli.
Abstr. Symp. Functions Microb. Membranes.

57. Verwer, R.W.H., Nanninga, N., Keck, W., and Schwarz, U. (1978). Arrangement of Glycan Chains in the Sacculus of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 136, 723-729.

58. Tomioka, S. and Matsuhashi, M. (1978). Purification of Penicillin-Insensitive DD-Endopeptidase, a New Cell Wall Peptidoglycan-Hydrolyzing Enzyme in Escherichia coli and Its Inhibition by Deoxyribonucleic Acids.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 84, 978-984.

59. Keck, W. and Schwarz, U. (1979). Escherichia coli Murein-DD-Endopeptidase Insensitive to β-Lactam Antibiotics.
J. Bacteriol. 139, 770-774.

60. Hakenbeck, R. and Messer, W. (1977). Activity of Murein Hydrolases in Synchronized Cultures of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 129, 1239-1244.

61. Beck, B.D. and Park, J.T. (1977). Basis for the Observed Fluctuation of Carboxypeptidase II Activity During the Cell Cycle in BUG 6, a Temperature-Sensitive Division Mutant of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 130, 1292-1302.

62. Ban Heijenoort, Y. and Van Heijenoort, J. (1971). Study of the N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase Activity in Escherichia coli.
FEBS Lett. 15, 137-141.

63. Van Heijenoort, J., Parquet, C., Flouret, B., and Van Heijenoort, Y. (1975). Envelope-Bound N-Acetylmuramyl-L-alanine Amidase of Escherichia coli K 12.
Eur. J. Biochem. 58, 611-619.

64. Parquet, C. (1979). Etude de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase de l'envelope de Escherichia coli K 12.
Dissertation, Université de Paris-Sud.

65. Wolf-Watz, H. and Normark, S. (1976). Evidence of a Role of N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase in Septum Separation in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 128, 580-586.

66. Gardner, A.D. (1940). Morphological Effects of Penicillin on Bacteria.
Nature 146, 837-838.

67. Park, J.T. (1952). Uridine-5'-Pyrophosphate Derivatives.
J. Biol. Chem. 194, 877-884.

68. Blumberg, P.M. and Strominger, J.L. (1974). Interaction of Penicillin with the Bacterial Cell: Penicillin-Binding Proteins and Penicillin-Sensitive Enzymes.
Bacteriol. Rev.38, 291-335.

69. Spratt, B.G. (1975). Distinct Penicillin Binding Proteins Involved in the Division, Elongation, and Shape of Escherichia coli K12.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2999-3003.

70. Cooper, P.D. (1956). Site of Action of Radiopenicillin.
Bacteriol. Rev. 20, 28-48.

71. Suginaka, H., Blumberg, P.M., and Strominger, J.L. (1972). Multiple Penicillin-Binding Components in Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 247, 5279-5288.

72. Blumberg, P.M. and Strominger, J.L. (1972). Five Penicillin-Binding Components Occur in Bacillus subtilis Membranes.
J. Biol. Chem. 247, 8107-8113.

73. Spratt, B.G. and Pardee, A.B. (1975). Penicillin-Binding Proteins and Cell Shape in E.coli.
Nature 254, 516-517.

74. Spratt, B.G. (1977). Properties of the Penicillin-Binding Proteins of Escherichia coli K 12.
Eur. J. Biochem. 72, 341-352.

75. Spratt, B.G. (1977). Temperature-Sensitive Cell Division Mutants of Escherichia coli with Thermolabile Penicillin-Binding Proteins.
J. Bacteriol. 131, 293-305.

76. Spratt, B.G., Jobanputra, V., and Schwarz, U. (1977). Mutants of Escherichia coli Which Lack a Component of Penicillin-Binding Protein 1 are Viable. FEBS Lett. 79, 374-378.

77. Ricard, M. (1972). Contribution à l'Etude de la Division Cellulaire chez E.coli K 12.
Dissertation, Faculté des Sciences de Paris VII.

78. Suzuki, H., Nishimura, Y., Iketani, H., Campisi, J., Hirashima, A., Inouye, M., and Hirota, Y. (1976).
J. Bacteriol. 127, 1494-1501.

79. Hoare, D.S. and Work, E. (1955). The Stereoisomers of αε-Diaminopimelic Acid: their Distribution in Nature and Behaviour towards certain Enzyme Preparations.
J. Biochem. 61, 562-568.

80. Davis, B.D. (1952). Biosynthetic Interrelations of Lysine, Diaminopimelic Acid, and Threonine in Mutants of Escherichia coli.
Nature 169, 534-536.

81. Mardarowicz, C. (1966). Isolierung und Charakterisierung des Murein-Sacculus von Brucella.
Z. Naturforsch. 21 b, 1006-1007.

82. Leutgeb, W. und Weidel, W. (1963). Ober ein in Coli-Zellwandpräparaten zurückgehaltenes Glykogen.
Z. Naturforsch. 18 b, 1060-1062.

83. Pelzer, H. (1965). Ein einfaches Verfahren zur Gewinnung beliebig großer Mengen bakterieller Zellwände und Stützmembranen.
Archiv Microbiol. 50, 334-342.

84. Eshdat, Y. and Mirelman, D. (1972). An Improved Method for the Recovery of Compounds from Paper Chromatograms.
J. Chromatogr. 65, 458-459.

85. Izaki, K. and Strominger J.L. (1968). Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls.
J. Biol. Chem. 243, 3193-3201.

86. Nguyen-Distèche, M., Ghuysen, J.-M., Pollock, J.J., Reinolds, P., Perkins, H.R., Coyette, J., and Salton, M.R.J. (1974). Enzymes Involved in Wall Peptide Crosslinking in Escherichia coli K 12, Strain 44.
Eur. J. Biochem. 41, 447-455.

87. Hayashi, K. (1975). A Rapid Determination of Sodium Dodecyl Sulfate with Methylene Blue.
Analyt. Biochem. 67, 503-506.

88. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

89. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., and van Alphen, L. (1975). Electrophoretic Resolution of the "Major Outer Membrane Protein" of Escherichia coli K 12 into Four Bands.
FEBS Lett. 58, 254-258.

90. Weber, K. and Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

91. Gerace, L., Blum, A., and Blobel, G. (1978). Immunocytochemical Localization of the Major Polypeptides of the Nuclear Pore Complex-Lamina Fraction.
Cell Biol. 79, 546-566.

92. Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974). A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels.
Eur. J. Biochem. 46, 83-88.

93. Weidel, W., Frank, H., and Martin, H.H. (1960). The Rigid Layer of the Cell Wall of Escherichia coli Strain B.
J. gen. Microbiol. 22, 158-166.

94. Cann, J.R. (1979). Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Interacting Systems. In: Electrokinetic Separation Methods. Ed. P.G. Righetti, C.J. van Oss and J.W. Vanderhoff (Elsevier/North-Holland Biomedical Press) 369-387.

95. Hare, D.L., Stimpson, D.I., and Cann, J.R. (1978). Multiple Bands Produced by Interaction of a Single Macromolecule with Carrier Ampholytes During Isoelectric Focusing.
Arch. Biochem. Biophys. 187, 274-275.

96. Rich, A., Davies, D.R., Crick, F.H.C., and Watson, J.D. (1961). The Molecular Structure of Polyadenylic Acid.
J. Mol. Biol. 3, 71-86.

97. Bickle, T.A., Pirrotta V., and Imber R. (1977). A Simple, General Procedure for Purifying Restriction Endonucleases.
Nucl. Acids Res. 4, 2561-2572.

98. Brennessel, B.A., Buhrer, D.P., and Gottlieb A.A. (1978). Use of Insoluble Heparin for Isolation of DNA Polymerase Enzymes from Murine Myeloma. Analyt. Biochem. 87, 411-417.

99. Sternbach, H., Engelhardt, R., and Lezius, A.G. (1975). Rapid Isolation of Highly Active RNA Polymerase from Escherichia coli and Its Subunits by Matrix-Bound Heparin. Eur. J. Biochem. 60, 51-55.

100. Mirelman, D., Yashouv-Gan, Y., and Schwarz, U. (1976). Peptidoglycan Biosynthesis in a Thermosensitive Division Mutant of Escherichia coli. Biochem. 15, 1781-1790.

101. Preusser, H.-J. (1969). Strukturveränderungen am "Murein-Sacculus" von Spirillum serpens nach Einwirkung von Uranylacetat. Arch. Mikrobiol. 68, 150-164.

102. Kelemen, M.V. and Rogers, H.J. (1971). Three-Dimensional Molecular Models of Bacterial Cell Wall Mucopeptides (Peptidoglycans). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 992-996.

103. Formanek, H., Formanek, S., and Wawra, H. (1974). A Three-Dimensional Atomic Model of the Murein Layer of Bacteria. Eur. J. Biochem. 46, 279-294.

104. Verwer, R.W.H. and Nanninga, N. (1976). Electron Microscopy of Isolated Cell Walls of Bacillus subtilis var. niger. Arch. Microbiol. 109, 195-197.

105. Burge, R.E., Fowler, A.G., and Reaveley, D.A. (1977). Structure of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls. J. Mol. Biol. 117, 927-953.

106. Fan, D.P. and Beckman, B. E. (1973). Structural Difference Between Walls from Hemispherical Caps and Partial Septa of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 114, 790-797.

107. Verwer, R.W.H., Beachey, E.H., Keck, W., Stoub, A.M., and Poldermans, J.E. (1980). Oriented Fragmentation of Escherichia coli Sacculi by Sonication. J. Bacteriol. in press.

108. Corran, P.H. and Waley, S.G. (1975). The Reaction of Penicillin with Proteins. Biochem. J. 149, 357-364.

109. de Pedro, M.A. and Schwarz, U. (1980). Heterogeneity of Newly Inserted and Preexisting Murein in the Sacculus of E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, submitted for publication.

110. Suzuki, H., van Heijenoort, Y., Tamura, T., Mizoguchi, J., Hirota, Y., and van Heijenoort, J. (1980). In Vitro Peptidoglycan Polymerization Catalyzed by Penicillin Binding Protein 1b of Escherichia coli K 12. Submitted for publication.

111. Nikodem, V. and Fresco, J.R. (1979). Protein Fingerprinting by SDS-Gel Electrophoresis after Partial Fragmentation with CNBr. Analyt. Biochem. 97, 382-386.

LEBENSLAUF:

Am 24.11.1949 wurde ich, Wolfgang Keck, als Sohn des Oberamtsrats Helmut Keck und seiner Ehefrau Ursula, geborene Riedel, in Stuttgart geboren. Im April 1956 wurde ich in Esslingen am Neckar eingeschult, 1961 wechselte ich an das Georgii-Gymnasium in Esslingen über, an dem ich am 10. Juni 1970 das Reifezeugnis erlangte. Ab Wintersemester 1970/71 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen Biologie. Für das Wintersemester 1971/72 wechselte ich an die Freie Universität in Berlin und kehrte zum Sommersemester 1972 nach Tübingen zurück. Dort absolvierte ich am 14. Juli 1972 die Prüfung zum Vordiplom. Im Sommersemester 1975 legte ich die theoretische Hauptdiplomprüfung im Hauptfach Mikrobiologie und in den Nebenfächern Biochemie, Pflanzenphysiologie und Genetik ab. Die Diplomarbeit wurde von August 1975 bis Juli 1977 am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, unter Anleitung von Dr. U. Schwarz durchgeführt. Am gleichen Institut arbeitete ich von August 1977 bis April 1980 unter Anleitung von Prof. A. Gierer und Dr. U. Schwarz an der Dissertation.

MEINE AKADEMISCHEN LEHRER WAREN:

E. Bayer
F.W. Bentrup
V. Braun
H. Diekmann
U. Feine
H. Frank
R. Frydrych
A. Gierer
H. Gnichtel
K.G. Grell
U. Henning
E. Kallee
S. Kemmler-Sack
H. Krüger
W. Loeffler
H. Lüers
K. Mägdefrau
H. Metzner
G.F. Meyer
F.P. Möhres
E. Müller
H. Pape
H. Probst
W. Rüdorff
E.M. Sander
U. Schwarz
B. Schwemmle
H. Seiler
W. Seyffert
E. Wachmann
K. Wegmann
G. Weitzel
U. Weser
G. Winkelmann
H. Zähner
K. Zetsche